

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Iva M. Rosić

**FENOTIPSKA I GENOTIPSKA ANALIZA
KAPACITETA *BACILLUS* SPP. IZOLATA ZA
KOLONIZACIJU, POSPEŠIVANJE RASTA
BILJAKA I BIOKONTROLU**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Iva M. Rosić

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC ANALYSIS
OF THE CAPACITY OF *BACILLUS* SPP.
ISOLATES FOR COLONIZATION, PLANT
GROWTH PROMOTION AND BIOCONTROL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentor:

Dr Olja Medić, docent

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

Dr Slaviša Stanković, redovni profesor i naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Tanja Berić, redovni profesor i naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu – Institut za fiziku, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr Ivan Nikolić, docent i viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Svetlana Milijašević-Marčić, naučni savetnik

Institut za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Želela bih da izrazim neizmernu zahvalnost svojoj mentorki dr Olji Medić na izuzetnoj posvećenosti, stručnom mentorstvu, ukazanom poverenju i nesebičnom deljenju teorijskog i praktičnog znanja, kao i vremena, koji su u velikoj meri oblikovali ovu disertaciju. Ogromno hvala na sjajnoj saradnji, podršci i slobodi u istraživanju i izražavanju naučnih ideja, što mi je omogućilo da rastem kao istraživač.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Ivanu Nikoliću, koji je bio aktivno uključen u razvoj moje naučne karijere još od master studija. Zahvaljujem na ohrabrivanju radoznalosti i podsticaju za istraživanje i najneobičnijih hipoteza, kao i na uvek inspirativnoj diskusiji i saradnji koja prevazilazi okvire ove disertacije.

Iskrenu zahvalnost dugujem prof. dr Slaviši Stankoviću na ukazanom poverenju, pruženoj prilici da se bavim naučnim radom, kao i na obezbeđivanju uslova za njegovo neometano odvijanje. Hvala Vam na izuzetnoj saradnji, prenesenom znanju i uvek izdvojenom vremenu za korisne, stručne i iskusne savete prilikom pisanja radova i same disertacije.

Duboku zahvalnost dugujem prof. dr Tanji Berić na otvorenosti i podršci za razne naučne ideje, korisnim diskusijama, izdvojenom vremenu i stručnost i iskustvu u pronalazenju rešenja za sve istraživačke dileme. Hvala Vam ukazanom poverenju, uvek prijatnoj i neposrednoj saradnji, kao i pružanju prilike za njen nastavak.

Dr Svetlani Milijašević-Marčić zahvaljujem na detaljnom, posvećenom i stručnom sagledavanju ove disertacije, kao i na korisnim sugestijama i savetima.

Ogromno hvala mojoj najboljoj laboratorijskoj partnerki, Marini Sokić, na svakodnevnom uživanju u eksperimentalnom radu, naučnim diskusijama i druženju izvan laboratorije. Hvala na podršci koja je omogućavala da i teške i neizvesne trenutke prebrodimo uz osmeh.

Veliko hvala mojoj dragoj kolegici dr Tamari Ranković na strpljenju, nesebičnom deljenju znanja i iskustva, kao i jasnim i detaljnim objašnjenjima laboratorijske prakse, koji su mi bili posebno dragoceni na samim počecima eksperimentalnog rada. Hvala na uvek prijatnoj atmosferi i druženju i van laboratorije.

Zahvaljujem se svim profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju, prof. dr Branki Vuković-Gaćić, prof. dr Biljani Nikolić i dr Dragani Mitić-Ćulafić, na pruženom teorijskom znanju iz mikrobiologije i prijatnoj i profesionalnoj saradnji.

Veliko hvala svim dragim kolegama koje sam upoznala na Katedri za mikrobiologiju tokom izrade ove disertacije, na uvek ugodnoj i prijateljskoj atmosferi, koja je rad u laboratoriji pretvarala u pravo uživanje. Posebni zahvaljujem: Ivani Marić, Tei Ganić, dr Stefani Spasović, dr Stefani Vuletić, Kristini Bošković, Ani Ignjatijević, Tamari Anđić, dr Nini Tomić i Sanji Jovanović.

Zahvaljujem prof. dr Jeleni Lozo, kao i kolegicama Aleksandri Mesaroš i Mariji Nedeljković, na odličnoj saradnji i uvek gostoljubivoj atmosferi u laboratoriji Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju.

Hvala dr Snežani Đorđević i Nikoli Đorđeviću na ustupanju kapaciteta kompanije „Agrounik“ za gajenje biljaka neophodnih za uspešno izvođenje eksperimenata u okviru ove disertacije.

Ovaj rad posvećujem mojoj sestri Anji i roditeljima Vesni i Mirku za bezuslovnu ljubav i podršku na koju uvek mogu da računam!

Fenotipska i genotipska analiza kapaciteta *Bacillus* spp. izolata za kolonizaciju, pospešivanje rasta biljaka i biokontrolu

Sažetak

Bacillus spp. sojevi ubrajaju se među najčešće istraživane i primenjivane agense za biokontrolu, biofertilizaciju i fitostimulaciju. Najveći izazov u njihovoj praktičnoj primeni jeste razlika između efikasnosti ostvarenoj u *in vitro* istraživanjima i onoj postignutoj *in planta*. Ključni problem leži u nemogućnosti preživljavanja i adaptacije na biotičke i abiotičke uslove u nišama u kojima su primenjeni, kao i u kolonizaciji biljnog tkiva. Na osnovu izražene *in vitro* sposobnosti biokontrole visoko virulentnog patogena filofsere šećerne repe, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21, soj identifikovan kao *Bacillus velezensis* SS-38.4 (prethodno *Bacillus amyloliquefaciens*), filogenetski blizak poznatom biokontrolnom soju *B. velezensis* FZB42, pokazao je superiornost u odnosu na ostale sojeve u *Bacillus* spp. kolekciji. Radi ispitivanja sposobnosti kolonizacije i praćenja dinamike populacije soja SS-38.4 u filosferi, razvijeni su soj-specifični SCAR_{38.4} prajmeri, uz optimizaciju kvantifikacije metodom kapljične digitalne lančane reakcije polimeraze (eng. *droplet digital Polymerase Chain Reaction* – ddPCR). Iako je izolovan iz zemljišta, ovaj soj je demonstrirao sposobnost preživljavanja i održavanja stabilne populacije u filosferi šećerne repe tokom perioda od sedam dana. Potencijalni biokontrolni mehanizmi, sagledani kroz analizu genoma, *in vitro* i *in planta* eksperimente, upućuju na dominantnu ulogu kompeticije za prostor i nutrijente, uz produkciju antimikrobnih jedinjenja, najverovatnije lipopeptida. Poređenjem sa genomom i aktivnošću P21, ustanovljeno je da surfaktini, formiranje biofilma, pokretljivost i produkcija siderofora doprinose kompetitivnoj prednosti soja SS-38.4, omogućavajući smanjenje populacije patogena P21. Iako je populacija soja P21 izrazito stabilna u filosferi kada je primenjen samostalno, i brojnija od populacije SS-38.4, primena biokontrolnog soja SS-38.4, bilo pre ili nakon inokulacije patogena, rezultirala je značajnim smanjenjem brojnosti fitopatogena i ublažavanjem simptoma lisne pegavosti šećerne repe. Ovaj efekat bio je naročito izražen u preventivnom tretmanu, gde je došlo do kontinuiranog pada brojnosti P21, i do potpunog izostanka rasta nakon 14 dana. U tom periodu, prosečna površina lista sa simptomima bolesti iznosila je svega 0,85%, u poređenju sa 13,45% u kontroli inokulisanoj P21. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da se soj SS-38.4 istakao kao perspektivni kandidat za dalja testiranja u polju i potencijalni razvoj formulacija za zaštitu biljaka baziranih na ovom soju.

Ključne reči: *Bacillus*, zaštita biljaka, kolonizacija filofsere, SCAR, ddPCR, komparativna genomika, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija mikroorganizama

Phenotypic and genotypic analysis of the capacity of *Bacillus* spp. isolates for colonization, plant growth promotion and biocontrol

Abstract

Bacillus spp. strains are among the most extensively studied and widely applied agents for biocontrol, biofertilization, and plant growth stimulation. However, the biggest challenge in their practical application lies in the discrepancies between the effects observed in *in vitro* studies and those achieved *in planta*. The key issue is their inability to survive and adapt to the biotic and abiotic conditions of the niches where they are applied, as well as their limited ability to colonize plant tissues. Based on its strong *in vitro* biocontrol potential against the highly virulent phyllosphere pathogen of sugar beet, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P21, a strain identified as *Bacillus velezensis* SS-38.4 (formerly known as *Bacillus amyloliquefaciens*), which is phylogenetically close to the well-known biocontrol strain *B. velezensis* FZB42, demonstrated superiority over other strains in the *Bacillus* spp. collection. To investigate the colonization ability and track the population dynamics of strain SS-38.4 in the phyllosphere, strain-specific SCAR_{38.4} primers were developed, and the ddPCR method was optimized for its quantification. Although originally isolated from soil, this strain exhibited the ability to survive and maintain a stable population in the sugar beet phyllosphere for seven days. Potential biocontrol mechanisms, analyzed through genome analysis, *in vitro* tests, and *in planta* experiments, suggested that competition for space and nutrients plays a dominant role, accompanied by the production of antimicrobial compounds, most likely lipopeptides. A comparison with the genome and activity of P21 revealed that the production of surfactins, biofilm formation, motility, and siderophore production contribute to the competitive advantage of strain SS-38.4, enabling a reduction in the P21 pathogen population. Although the P21 strain is highly stable in the phyllosphere when applied alone and its population outnumbers SS-38.4, the preventive or curative application of SS-38.4, led to a significant reduction in the P21 population and a decrease in leaf spot disease symptoms. This effect was particularly pronounced in the preventive treatment, where a continuous decline in P21 population was observed, ultimately resulting in its complete absence by the 14th day. During this period, the average affected leaf area was only 0.85%, compared to 13.45% in the P21 control. The results of this study confirmed that strain SS-38.4 has emerged as a promising candidate for further field testing and the potential development of biocontrol formulations.

Keywords: *Bacillus*, plant protection, phyllosphere colonization, SCAR, ddPCR, comparative genomics, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biology of microorganisms

SADRŽAJ:

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1 Rod <i>Bacillus</i> - nekad i sad | 1 |
| 1.2 <i>Bacillus</i> spp. u zaštiti i pospešivanju rasta biljaka | 3 |
| 1.3 Mehanizmi biološke kontrole biljnih patogena i pospešivanja rasta biljaka primenom <i>Bacillus</i> spp. | 6 |
| 1.3.1 Mehanizmi biološke kontrole | 7 |
| 1.3.1.1 Sinteza sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću | 7 |
| 1.3.1.2 Sinteza isparljivih organskih jedinjenja | 9 |
| 1.3.1.3 Produkcija ekstracelularnih enzima | 9 |
| 1.3.1.4 <i>Quorum quenching</i> | 10 |
| 1.3.1.5 Kompeticija za prostor i nutrijente | 10 |
| 1.3.1.6 Indukcija sistemske rezistencije | 11 |
| 1.3.2 Mehanizmi pospešivanja rasta biljaka | 11 |
| 1.3.2.1 Solubilizacija nutrijenata | 12 |
| 1.3.2.2 Povećanje raspoloživosti azotnih jedinjenja | 13 |
| 1.3.2.3 Isparljiva neorganska jedinjenja | 13 |
| 1.3.2.4 Biljni hormoni | 14 |
| 1.3.2.5 Odgovor na abiotički stres | 14 |
| 1.4 Izazovi u primeni <i>Bacillus</i> spp. u zaštiti biljaka | 15 |
| 1.5 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> kao folijarni patogen šećerne repe | 15 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 18 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 20 |
| 3.1 Sojevi bakterija | 20 |
| 3.2 Medijumi za gajenje bakterija | 20 |
| 3.3 Rastvori i reagensi | 22 |
| 3.4 Genetičko profilisanje i procena diverziteta <i>Bacillus</i> spp. kolekcije | 23 |
| 3.5 Dizajn RAPD-SCAR prajmera za ddPCR | 26 |
| 3.5.1 Kloniranje i sekvenciranje jedinstvenih RAPD amplikona | 26 |
| 3.5.2 Dizajn i testiranje specifičnosti SCAR prajmera | 27 |
| 3.6 Procena diverziteta <i>Bacillus</i> spp. kolekcije analizom gena za acil-homoserin laktone | 29 |
| 3.7 <i>In vitro</i> testovi na <i>Bacillus</i> spp. kolekciji | 30 |
| 3.7.1 Utvrđivanje antagonističkog dejstva <i>Bacillus</i> spp. izolata | 30 |
| 3.7.2 Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida <i>Bacillus</i> spp. sojeva | 31 |
| 3.7.3 Ispitivanje <i>quorum quenching</i> aktivnosti <i>Bacillus</i> spp. izolata | 32 |

| | |
|---|----|
| 3.7.4 Ispitivanje solubilizacije minerala | 33 |
| 3.7.5 Ispitivanje produkcija amonijaka, indol-3-sirćetne kiseline i cijanovodonika | 33 |
| 3.7.6 Ispitivanje produkcije biofilma i pokretljivost tipa plivanja i rojenja..... | 33 |
| 3.8 <i>In planta</i> testovi..... | 34 |
| 3.8.1 <i>In planta</i> testiranje inhibitorne aktivnosti odabranih etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida.... | 34 |
| 3.8.2 Praćenje kolonizacije filofsfera šećerne repe i biokontrolne aktivnosti SS-38.4 <i>in planta</i> | 35 |
| 3.9 Analiza genoma biokontrolnog soja SS-38.4..... | 38 |
| 3.9.1 Sekvenciranje, asembliranje i anotacija genoma soja SS-38.4..... | 38 |
| 3.9.2 Filogenija, taksonomija i komparativna genomika..... | 38 |
| 3.9.3 Mapiranje gena za PGP osobine, kolonizaciju biljaka, biokontrolnu aktivnost i adaptaciju na negativne faktore sredine | 39 |
| 4. REZULTATI | 41 |
| 4.1 Odabir najbolje metode za genetičko profilisanje i procenu diverziteta <i>Bacillus</i> spp. izolata iz prirode | 41 |
| 4.2 Dizajn i odabir SCAR prajmera za specifičnu detekciju biokontrolnog soja..... | 43 |
| 4.3 Optimizacija SCAR _{38.4} -ddPCR metode..... | 46 |
| 4.4 <i>In vitro</i> biokontrolna aktivnost <i>Bacillus</i> spp. sojeva | 47 |
| 4.4.1 Biokontrolna aktivnost supernatanta i lipopeptidnih ekstrakata..... | 47 |
| 4.4.2 Biokontrolna aktivnost preko <i>quorum quenching</i> mehanizma..... | 49 |
| 4.4.3 Molekularni i funkcionalni diverzitet AHL-laktonaza <i>Bacillus</i> spp. izolata iz različitih prirodnih staništa | 51 |
| 4.4.4 PGP aktivnosti kao kompetitivne osobine SS-38.4 i P21 sojeva | 55 |
| 4.5 Rezultati biokontrolne aktivnosti i sposobnosti kolonizacije soja SS-38.4 <i>in planta</i> | 56 |
| 4.5.1 Biokontrolna aktivnost etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida odabranih <i>Bacillus</i> spp. sojeva | 56 |
| 4.5.2 Dinamika populacija SS-38.4 i P21 u filofsferi i biokontrolni efekat suspenzije SS.38.4 | 58 |
| 4.5.2.1 Relativna i apsolutna metoda procene sposobnosti kolonizacije soja SS-38.4..... | 58 |
| 4.5.2.2 Dinamika populacija SS-38.4 i P21 | 58 |
| 4.5.2.3 Biokontrolna aktivnost SS-38.4 | 59 |
| 4.6 Analiza genoma <i>B. velezensis</i> SS-38.4..... | 61 |
| 4.6.1 Opšte karakteristike genoma | 61 |
| 4.6.2 Taksonomija i filogenija | 61 |
| 4.6.3 Analiza pangjenoma | 63 |
| 4.6.3.1 Geni asocirani sa PGP osobinama u genomima SS-38.4 i P21 | 65 |
| 4.6.3.2 Geni asocirani sa kolonizacijom biljaka | 65 |
| 4.6.3.3. Geni asocirani sa sintezom ekstracelularnih enzima..... | 65 |
| 4.6.3.4 Geni SS-38.4 soja asocirani sa sintezom sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću | 65 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.3.5 Geni SS-38.4 asocirani sa adaptacijama na negativne faktore sredine | 66 |
| 4.6.3.6 Geni SS-38.4 asocirani sa virulencijom i rezistentnošću na negativne hemijske faktore | 66 |
| 5. DISKUSIJA | 69 |
| 6. ZAKLJUČCI | 78 |
| 7. LITERATURA | 81 |
| 8. PRILOZI | 82 |

1. UVOD

1. UVOD

1.1 Rod *Bacillus* - nekad i sad

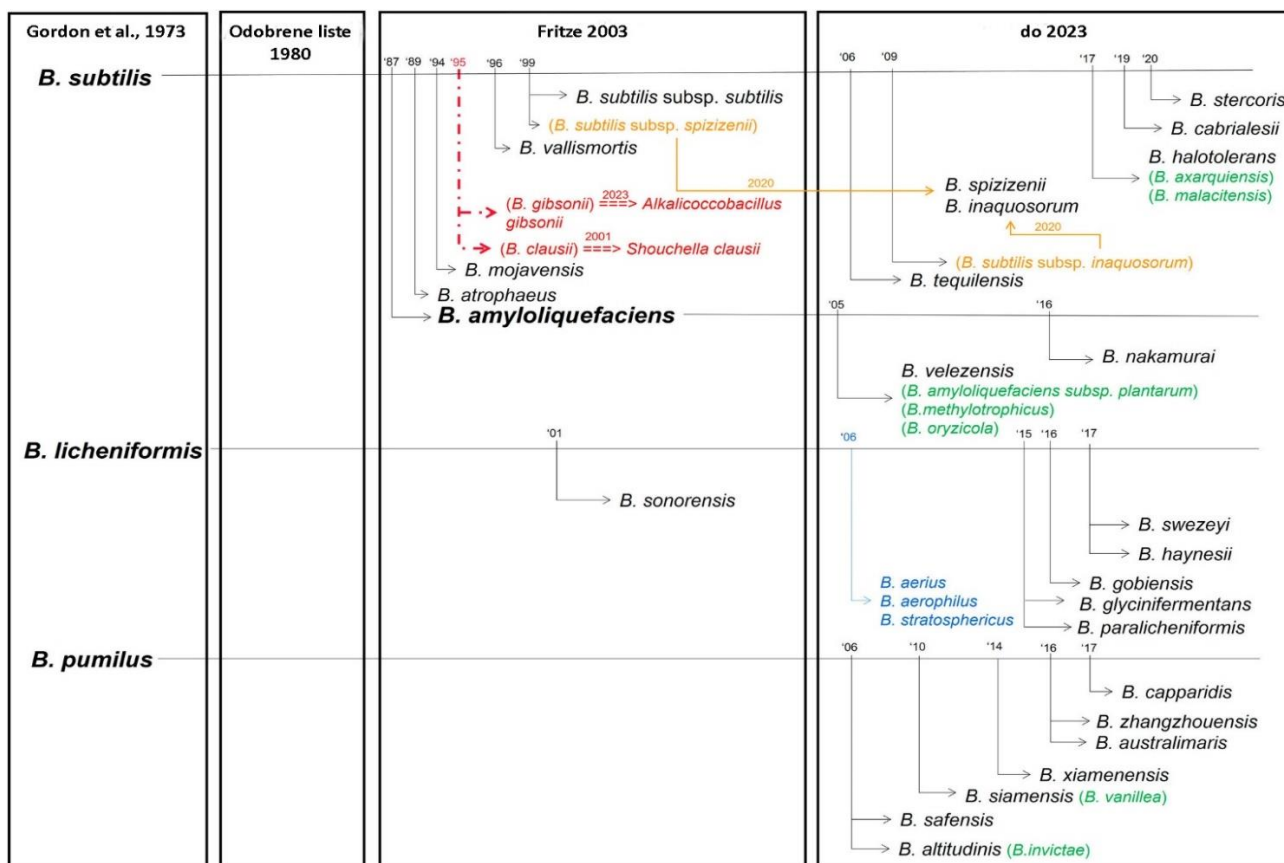
Pre skoro dva veka je iz sena izolovana štapičasta bakterija “*Vibrio subtilis*”, preimenovana u *Bacillus subtilis* 40 godina kasnije (Slepecky & Hemphill, 2006). Sa tim otkrićem definisani su kriterijumi za klasifikaciju bakterija u rod *Bacillus* (Carstvo Bacteria; Razdeo Firmicutes; Klasa Bacilli; Red Bacillales; Familija Bacillaceae): štapičast oblik ćelije, gram-pozitivno bojenje ćelijskog zida, aerobni metabolizam i sposobnost formiranja endospora, koje omogućavaju preživljavanje nepovoljnih uslova sredine (Madigan et al., 2018). Međutim, ovakvi opšti uslovi za klasifikaciju nisu uspeli da objedine sve vrste koje će kasnije biti identifikovane kao *Bacillus* sp., dok su obuhvatili brojne nesrodne vrste, kreirajući filogenetski heterogen rod (Hernández-González et al., 2018). To je dovelo do zabune u taksonomiji, koja ni do danas nije u potpunosti razrešena (Blanco Crivelli et al., 2024).

Pored navedenih morfoloških karakteristika, koje su dopunjene opisivanjem fakultativno anaerobnih i anaerobnog predstavnika (*Bacillus infernus*) i pokretljivosti posredovane flagelama kod većine vrsta (izuzetak *Bacillus anthracis* i pojedini *Bacillus cereus* sojevi), *Bacillus* spp. ne dele mnogo zajedničkih osobina (Boone et al., 1995; Koehler, 2009). *Bacillus* spp. mogu da žive u najrazličitijim uslovima, što sugerise i diverzitet staništa iz kojih su izolovani (Mandic-Mulec et al., 2015). Zemljište i biljke predstavljaju najčešće izvore, a izolovani su i iz slatkih i marinski voda, hrane, životinja i ekstremnih staništa – termalnih izvora, pustinja, permafrosta, naftnih postrojenja i sredina zagađenih teškim metalima (Deng et al., 2023; Sun et al., 2024). Iako je za njihovo prisustvo u ekstremnim sredinama odgovorna i sposobnost formiranja endospora, postoje i predstavnici koji su u ovim staništima metabolički aktivni - termofilni, psihrofilni i halofilni (Harirchi et al., 2022). Život *Bacillus* spp. u različitim sredinama odražava se i kroz diverzitet hemoorganotrofnog ili hemolitotrofnog metabolizma, korišćenjem različitih supstrata kao izvora energije. Rezultujući primarni i sekundarni produkti metabolizma i enzimi su značajni u brojnim granama industrije: biotehnologiji, poljoprivredi, farmaciji, prehrambenoj i hemijskoj industriji.

Sa porastom dostupnosti sekvenciranja celih genoma i razvoja genomike, poslednjih godina aktuelna je reklasifikacija predstavnika roda *Bacillus*, sa ciljem jasnije sistematike vrsta koje se ne mogu identifikovati na osnovu fenotipskih (morfoloških i biohemijskih karakteristika), kao ni prema opšte prihvaćenoj metodi molekularne identifikacije vrsta, sekvenciranjem gena za 16S rRNK (Fan et al., 2017). Od sedam poznatih vrsta iz roda *Bacillus* u vreme Kohovih i Konovih istraživanja (*Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *Priestia (Bacillus) megaterium*, *Bacillus mycoides*, *B. cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*), broj vrsta je doživeo ekspanziju početkom 20. veka, kada je *Bacillus* rod obuhvatao većinu štapičastih bakterija, čemu i svedoči izdanje *Index Bergeyana* sa 8000 *Bacillus* vrsta, od kojih je većina sada svrstana u druge rodove (Claus & Fritze, 1989). Krajem 20. veka nakon opsežnih molekularnih analiza, broj je pao na 54 prihvaćene vrste (Wang et al., 2009). Danas, je u rod *Bacillus* svrstano 435 vrsta prema Listi imena prokariota sa evidencijom u nomenklaturi (eng. *List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature-LPSN*) (Blanco Crivelli et al., 2024). Međutim, nakon komparativne analize više od 300 *Bacillus* spp. genoma (Gupta et al., 2020), predložena je reklasifikacija prema kojoj bi rod *Bacillus* obuhvatao samo vrste iz *B. subtilis* i *B. cereus* klada, dok bi se ostale vrste klasifikovale u nove rodove. Prihvaćeno je 20 novih rodova: *Brevibacillus (Bacillus brevis* klaster), *Aneurinibacillus (Bacillus aneurinolyticus* klaster), *Geobacillus (Bacillus stearothermophilus* klaster), *Lysinibacillus (Bacillus fusiformis* i *Bacillus sphaericus)*, *Paenibacillus (Bacillus polymyxa* klaster), *Alicyclobacillus (Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris* i *Bacillus cycloheptanicus)*, *Alkalicoccus (Bacillus saliphilus* klaster), *Aneurinibacillus (Bacillus thermoaerophilus)*, *Gracilibacillus (Bacillus dipsosauri* klaster), *Hydrogenibacillus (Bacillus schlegelii)*, *Sporosarcina (Bacillus globisporus, Bacillus psychrophilus, Bacillus pasteurii)*, *Ureibacillus (Bacillus thermosphaericus)*, *Solibacillus (Bacillus salexigens)*, *Virgibacillus (Bacillus pantothenicus)*, *Peribacillus (Bacillus simplex* klada), *Cytobacillus (Bacillus firmus* klada), *Mesobacillus (Bacillus jeotgali* klada), *Neobacillus (Bacillus*

niacini klada), *Metabacillus* (*Bacillus fastidiosus* klada), *Alkalihalobacillus* (*Bacillus alcalophilus* klada) i *Shouchella* (*Bacillus clausii*).

„*B. subtilis*“ grupa obuhvata vrste genetički blisko srodne *B. subtilis*, koje se fenotipski međusobno ne mogu razlikovati (Rooney et al., 2009). Poznati su po produkciji velikog broja različitih sekundarnih metabolita – u proseku 4-5% njihovih genoma čine geni uključeni u sintezu sekundarnih metabolita (Kaspar et al., 2019). Najveći broj metabolita ima antibakterijski i antifungalni efekat ili su elicitori sistemske rezistencije kod biljaka, tako da čine značajnu grupu biostimulanata i biopesticida, važnih za pospešivanje rasta biljaka (eng. *Plant Growth Promotion* – PGP) i biološku kontrolu (Hashem et al., 2019). Pre reklasifikacije 2020. godine, prvobitni predstavnici ove grupe, *B. subtilis*, *B. licheniformis* i *Bacillus pumilus*, zajedno sa *Bacillus amyloliquefaciens* činili su *B. subtilis* kompleks vrsta, a svaka od četiri vrste bila je predstavnik istoimene klade (Gupta et al., 2020): I klada („*subtilis*“), II klada („*amyloliquefaciens*“ ili „Operativna grupa *B. amyloliquefaciens*“), III klada („*licheniformis*“) i IV klada („*pumilus*“). Broj vrsta koje pripadaju određenoj kladi se menjao tokom vremena, a opšte prihvaćene vrste prikazane su na Slici 1 (vertikalne strelice, crno). Nakon reklasifikacije 2020. godine, sve vrste iz navedene četiri klade su i dalje deo nove „*subtilis*“ grupe, kao jasno izdvojeni klasteri na filogenetskom stablu, sa dodatim novootkrivenim vrstama (Slika 1).

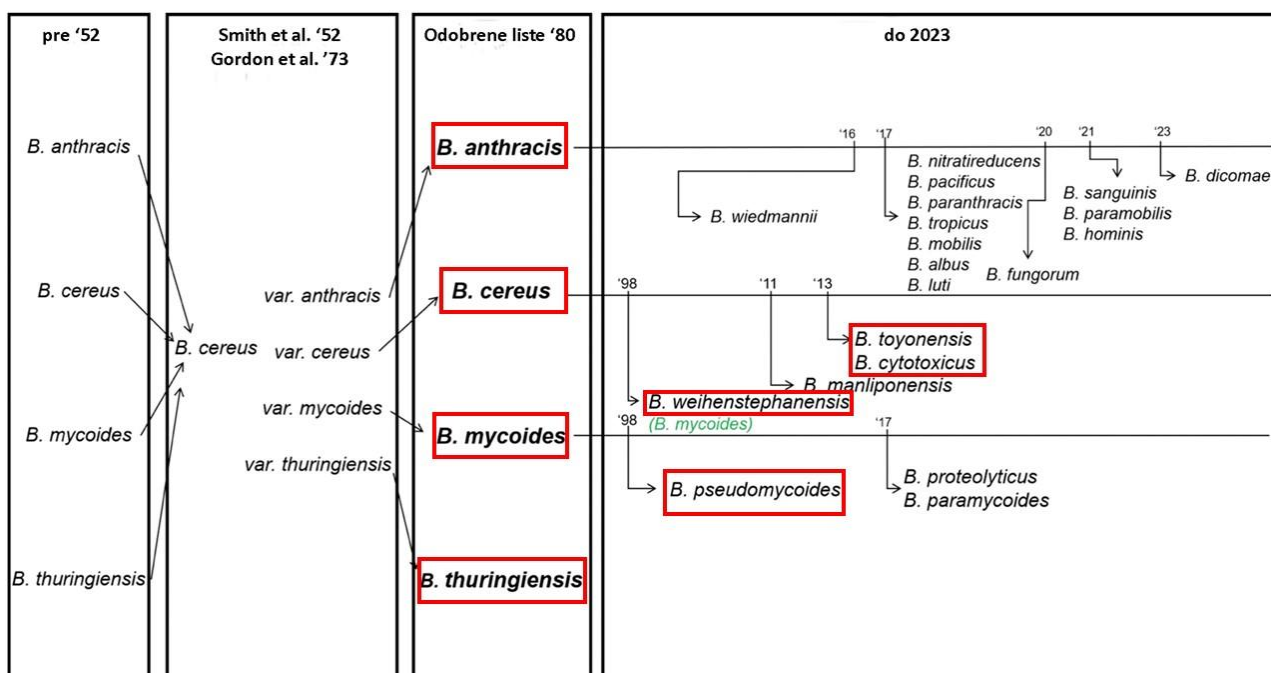


Slika 1. Promene u taksonomiji vrsta roda *Bacillus*, filogenetski srodnih vrsta *Bacillus subtilis* (Preuzeto i modifikovano iz Xu et al., 2024).

B. cereus grupa obuhvata genetički slične i filogenetski srodne vrste, ali koje se mogu razlikovati u pojedinim fenotipskim karakteristikama (pokretljivosti, morfologiji kolonija i tipovima produkovanih toksina) (Ehling-Schulz et al., 2019). Najpoznatija je po humanim patogenima različitog stepena virulencije, izazivačima antraksa i sistemskih, lokalizovanih i oportunističkih infekcija digestivnog sistema, očuju i rana (Baldwin, 2020). Međutim, pojedini sojevi *Bacillus thuringiensis* i *B. cereus* imaju veliki značaj u poljoprivredi. Poznat primer je primena *B.*

thuringiensis u biološkoj kontroli insekata štetočina, kao biopesticida, dok *B. cereus* može biti deo mikrobiote rizosfere biljaka, sa ulogom u pospešivanju rasta (Sorokan et al., 2023). Pre reklasifikacije 2020. godine, *B. cereus* kompleks vrsta činilo je osam vrsta (Slika 2, crveni okvir) raspoređenih u pet klada. Karakteristično je da su različiti sojevi jedne vrste mogli biti klasifikovani u različite klade, usled intraspecijskih genotipskih razlika i sličnosti fenotipskih karakteristika: I klada („*anthracis*“), II klada („*ceruus/thuringiensis*“), III klada („*weihenstephanensis*“), IV i V klada obuhvataju različite sojeve navedenih vrsta. Danas, svih osam vrsta, zajedno sa novootkrivenim (Slika 2) čine „*ceruus*“ grupu.

„*B. cereus*“ grupa se jasno genetički i filogenetski razlikuje od „*subtilis*“ klade. Međutim, reklasifikaciju „*ceruus*“ klade u novi rod ne preporučuje Međunarodni kodeks nomenklature prokariota (eng. *International Code of Nomenclature of Prokaryotes*) zbog prisustva važnih humanih patogena (Gupta et al., 2020).



Slika 2. Promene u taksonomiji vrsta roda *Bacillus*, filogenetski srodni vrsta *Bacillus cereus* (Preuzeto i modifikovano iz Xu et al., 2024).

Precizna taksonomija *Bacillus* spp. je od suštinskog značaja za njihovu praktičnu primenu, posebno u zaštiti i pospešivanju rasta komercijalno gajenih biljaka. Temeljno razumevanje aktivnosti, potencijalnih korisnih produkata metabolizma i uloge u ekosistemu ključno je za bezbednu primenu predstavnika ovog roda (Villarreal-Delgado et al., 2018; Dunlap et al., 2019; Vishwakarma et al., 2024).

1.2 *Bacillus* spp. u zaštiti i pospešivanju rasta biljaka

Sama praksa primene prirodnih neprijatelja štetočina u zaštiti useva datira još iz antičkog perioda i predstavlja rani koncept biološke kontrole (van den Bosch et al., 1982). Prva formalna definicija (Garcia et al., 1988) se takođe bazirala na primeni krupnih organizama, pre svega korisnih insekata, a sredinom 20. veka proširena je i na korisne mikroorganizme (bakterije, gljive, protozoe i viruse), koji se sada aktivno istražuju i široko primenjuju (Bale te al., 2008; He et al., 2021). Prema danas prihvaćenoj definiciji, biološka kontrola (biokontrola) predstavlja primenu živih organizama u direktnom ili indirektnom suzbijanju patogena i štetočina, zarad dobrobiti čoveka (Stenberg et al., 2021).

Mikrobiološki biokontrolni agensi se u regulativama EU i SAD, najčešće označavaju kao mikrobiološki biopesticidi (Stenberg et al., 2021). Mogu se primenjivati kao klasični i augmentativni biokontrolni agensi, čiji je glavni cilj uspostavljanje dugoročne i stabilne zaštite biljaka. Pod augmentativnom biokontrolom podrazumeva se periodična intervencija čoveka, koja podrazumeva dodavanje autohtonih korisnih bakterija u mikrobioti biljke radi povećanja njihove brojnosti, a koje ispoljavaju biokontrolnu aktivnost protiv ciljnog patogena. Nasuprot tome, klasična biokontrola predstavlja uvođenje mikroorganizama u nišu u kojoj se oni prirodno ne nalaze (Collier et al., 2004).

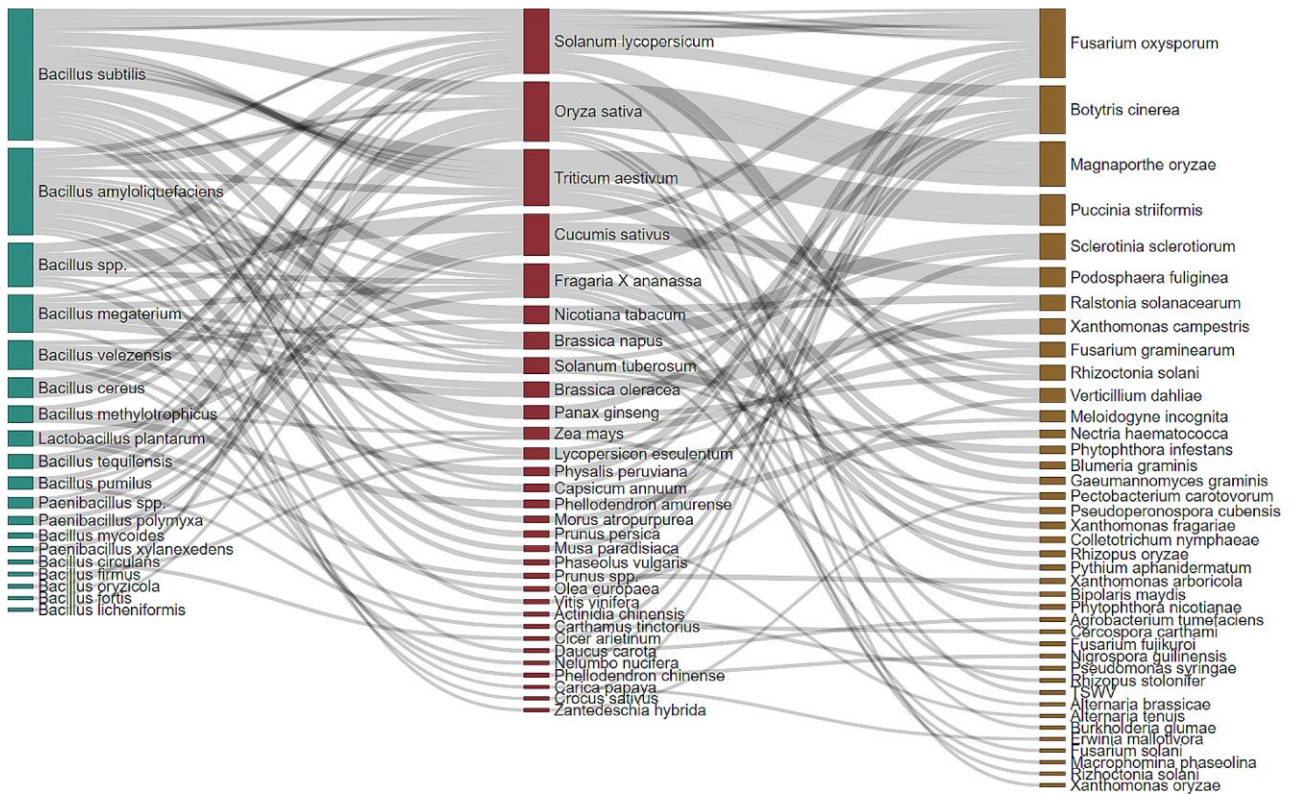
Iako je biološka kontrola aktivnost koja se može primeniti u različitim oblastima u kojima je suzbijanje za čoveka nepoželjnih organizama važno (npr. medicini, šumarstvu, akvakulturi), najveći broj fundamentalnih i primenjenih istraživanja vezan je za poljoprivredu i zaštitu useva od bakterijskih i fungalnih patogena i štetnih insekata i nematoda. To je upravo zbog potrebe za ograničenjem upotrebe sintetičkih pesticida, koji se uprkos značaju za razvoj poljoprivrede u prošlosti, već duže vreme zloupotrebljavaju usled povećanih zahteva svetskog tržišta (Dhuldhaj et al., 2023). Njihova prekomerna i često neadekvatna primena dovela je do brojnih negativnih uticaja na životnu sredinu i sve izraženiju pojavu rezistentnosti kod patogenih organizama. Sintetički pesticidi negativno utiču i na brojne neciljne organizme usled njihovog nespecifičnog delovanja, među kojima su zemljišni mikroorganizmi i mikrobiota gajenih biljaka. Pored toga, sintetički pesticidi mogu direktno helirati jone metala u zemljištu (gvožđe, cink, mangan, magnezijum), čime ih čine nedostupnim biljkama, što može negativno uticati na proces fotosinteze i razmnožavanje biljaka (Ayilara et al., 2023). Još jedan značajan problem predstavlja njihova postojanost u životnoj sredini. Veliki deo primenjenih pesticida se ne razgrađuje, tako da putem erozije, spiranjem ili neadekvatnim odlaganjem mogu dospeti u površinske i podzemne vode, utičući na organizme izvan poljoprivrednih sistema, uključujući kopnene i vodene životinje, kao i biljke koje nisu ciljani usevi. Uprkos tome što sintetički pesticidi i dalje dominiraju tržištem, najviše zahvaljujući optimizovanoj proizvodnji i dostupnosti, biopesticidi, naročito mikrobiološki, predstavljaju sve značajniju i održiviju alternativu. Prednost biopesticida je upravo u odgovoru na probleme koje prouzrokuje primena sintetičkih pesticida. Biorazgradivi su, ne akumuliraju se u prirodi, ne štete neciljanim organizmima, sporije dovode do razvoja rezistentnosti kod patogena i poseduju brojne mehanizme delovanja. Mikrobiološki pesticidi imaju i dodatnu prednost koja se ogleda u dostupnosti i relativno lakoj izolaciji iz prirodnih sredina i jednostavnom i ekonomski isplativom gajenju u većim količinama u industrijskim bioreaktorima. Stoga su očekivanja od biokontrole velika. Daljim istraživanjem pruža se mogućnost ostvarivanja istog efekta zaštite biljaka, uz očuvanje životne sredine, održavanja globalnog zdravlja i smanjenje troškova proizvodnje i obrade komercijalno značajnih biljaka (Schaffner et al., 2024).

Potencijal *Bacillus* spp. u biokontroli prvi put je zapažen nakon praćenja antagonističkih interakcija među tada novootkrivenim vrstama bakterija ovog roda. Kasnija istraživanja su to potvrdila otkrivanjem brojnih mehanizama biokontrole, njihove sveprisutnosti u različitim staništima, izražene otpornosti na negativne uticaje sredine i bezbednosti po zdravlje i životnu sredinu najvećeg broja vrsta. Vrsta *B. thuringiensis* (Bt) izolovana iz inficiranih larvi svilenih buba (Milner, 1994; Kumar et al., 2021) je prvi dokazan primer biokontrole primenom *Bacillus* spp sojeva. Primećeno je da tretiranje larvi svilenih buba sporama Bt dovodi do uginuća i posledično smanjenja njihovih populacija, i u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Bravo et al., 2007). Iako u to vreme mehanizam biokontrolnog dejstva Bt nije bio poznat, 30-ih godina je registrovan prvi insekticidni preparat na bazi spora Bt u Francuskoj, pod nazivom „Sporeine“ (Sanahuja et al., 2012). Različite podvrste Bt proizvode δ -toksine, cry (kristalni) i cyt (citolitički), koji ostvaruju specifičan biokontrolni efekat na insekte iz redova Lepidoptera, Diptera i Coleoptera. Neki sojevi su specifični i za nematode, pokazujući sličan mehanizam delovanja (Ramalakshmi et al., 2020). Zahvaljujući specifičnom ciljanom delovanju i visokoj efikasnosti, biokontrolni produkti na bazi Bt su do sada najuspešniji preparati na bazi *Bacillus* spp. sojeva, koji čine 90% ukupnog tržišta biopesticida (Chaudhary et al., 2024).

Predstavnici „*Bacillus subtilis*“ grupe i njihova dominantna sinteza sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću, prvobitno su istraživani u medicinske svrhe, zarad potrage za antibioticima (Stülke et al., 2023). Ispitivanje njihove biokontrolne aktivnosti protiv biljnih patogena nije bilo aktuelno sve do sredine 20. veka, kada je dokazan fungicidni efekat *B. subtilis* na *Rhizoctonia* sp. i *Phytophthora* sp. (Jang et al., 2023). I danas su predstavnici ove grupe najviše primenjivani u biokontroli bakterijskih i fungalnih patogena (Slika 3). Mehanizmi biokontrole fitopatogena su brojniji i manje specifični od biokontrole insekata ili nematoda primenom Bt, što se i odražava na manji broj uspešnih i registrovanih preparata na bazi predstavnika „*B. subtilis*“ grupe. Te razlike u efikasnosti posebno dolaze do izražaja pri primeni preparata u realnim, suboptimalnim poljskim uslovima. U takvim uslovima, cilj biokontrolnog agensa nije samo suzbijanje biljnog patogena već i uspešna adaptacija na faktore sredine, preživljavanje u datoj niši i dostizanje kritične brojnosti potrebne za ostvarivanje biokontrolnog efekta (Maurer et al., 2013; Legein et al., 2020; Compant & Sessitsch, 2021).

Iako postoje tendencije da se razgraniče i zasebno definišu pojmovi biološke kontrole i pospešivanja rasta biljaka, u praksi je teško sa sigurnošću utvrditi da li je suzbijanje biljnog patogena posledica direktnog dejstva na samog fitopatogena ili pak pozitivnog dejstva biokontrolnog agensa na biljku (Compant et al., 2005; Santoyo et al., 2013; El-Saadony et al., 2022). Najveći broj biokontrolnih agenasa poseduje i PGP aktivnost, tako da se pozitivan efekat uglavnom ostvaruje kombinacijom različitih mehanizama biokontrole i PGP (Ji et al., 2022). Bakterije koje poseduju PGP aktivnost se prema EU regulativama o fertilizatorima svrstavaju u grupu biostimulanata. Prema najnovijoj definiciji, biljni biostimulanti predstavljaju grupu prirodnih jedinjenja ili mikroorganizama (bakterije i gljive) koji nakon primene omogućavaju efikasnije usvajanje nutrijenata, povećanu toleranciju na abiotički stres i generalno poboljšavaju kvalitet komercijalno gajenih biljaka (Stenberg et al., 2021). Takođe, značajno je istaći da primena bakterija sa PGP aktivnostima, kao i biokontrolnih agenasa, predstavlja „zelenu“ zamenu za veštačka i hemijska đubriva, pa se prema pojedinim definicijama svrstavaju i u biofertilizatore (Luo et al., 2022).

Prva istraživanja potencijala *Bacillus* spp. kao biostimulanata započeta su pre više od jednog veka, introdukcijom *B. subtilis* u rizosferu žitarica, dok su od 70-ih godina postala aktuelna (Broadbent et al., 1971). Upravo u tom periodu su započeta i ispitivanja interakcija biljaka i mikroorganizama, kojim je utvrđeno da predstavnici roda *Bacillus* mogu okupirati različite niše biljke, pri čemu mogu biti slobodnoživeći, simbionti ili endosimbionti (Radhakrishnan et al., 2017). Zahvaljujući tim istraživanjima, *Bacillus* spp. su prepoznati i kao značajni članovi mikrobiote velikog broja biljaka (Etesami et al., 2023).



Slika 3. Senkijev dijagram veza između različitih vrsta roda *Bacillus* (zeleno), poljoprivrednih kultura (crveno) i patogenih gljiva i bakterija (žuto). Dijagram ukazuje da je u najvećem broju istraživanja ispitivana biološka kontrola *Fusarium oxysporum* na paradajzu (*Solanum lycopersicum*) primenom *B. subtilis* sojeva (Preuzeto iz Serrão et al., 2024).

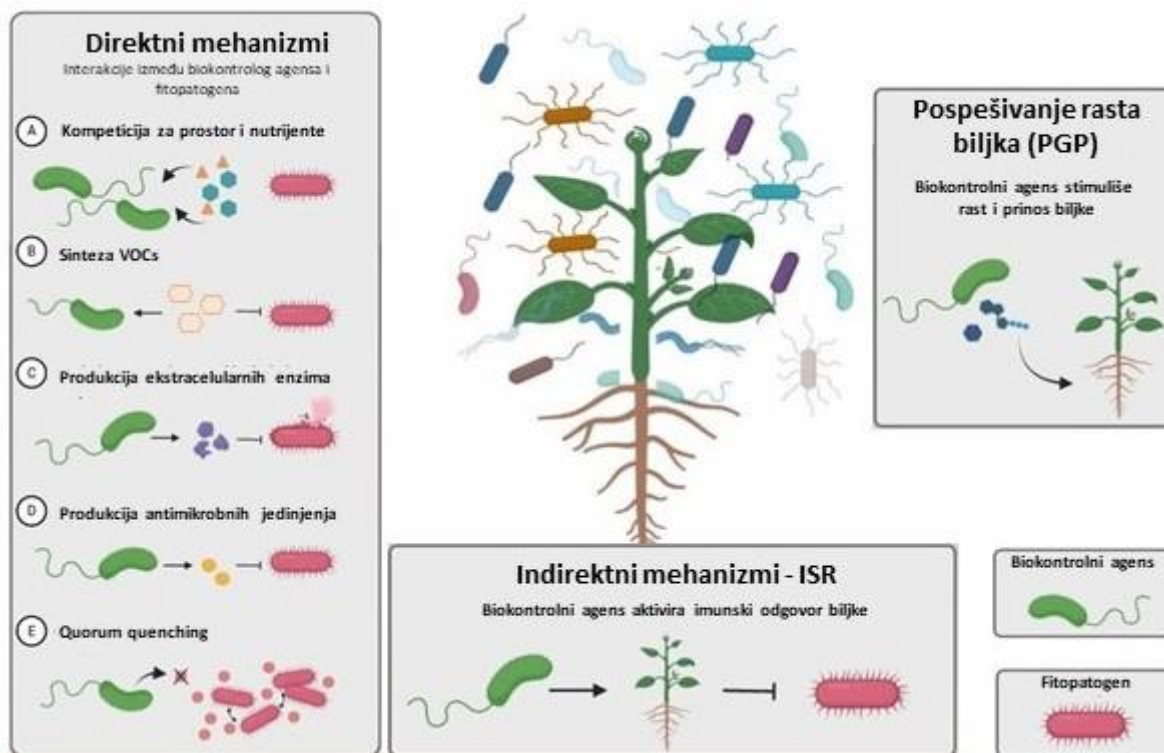
1.3 Mehanizmi biološke kontrole biljnih patogena i pospešivanja rasta biljaka primenom *Bacillus* spp.

Istraživanja i praktična primena *Bacillus* spp. na različite biljke pokazali su da, iako jedan mehanizam biokontrole i/ili pospešivanja rasta može biti dominantan, celokupan pozitivan efekat na biljku se ostvaruje simultanim i sinregističkim delovanjem većeg broja različitih mehanizama (Wang et al., 2018; Zhang et al., 2023). Kako se na osnovu definicije biokontrolna aktivnost posmatra u odnosu na fitopatogena, a pospešivanje rasta kao efekat na samu biljku, isti mehanizam može istovremeno doprinostiti i suzbijanju patogena i poboljšanju rasta i prinosa biljke. Kao primer može se izdvojiti produkcija siderofora kod pojedinih *Bacillus* spp. predstavnika (Deb & Tatung, 2024). U biološkoj kontroli produkcija siderofora je kompetitivna osobina koja omogućava *Bacillus* spp. vezivanje i usvajanje esencijalnog nutrijenta gvožđa. Pored toga, neki tipovi siderofora mogu imati antimikrobni efekat na biljnog patogena i elicirati sistemsku rezistenciju kod biljaka (Kamath et al., 2025). U pospešivanju rasta biljaka, ova sposobnost *Bacillus* spp. iskorišćena je u solubilizaciji jedinjenja gvožđa, odnosno njegovom prevođenju u oblik dostupan biljkama (Xie et al., 2024). Sinergizam i mnogostrukost mehanizama delovanja se mogu primetiti i samo na efektu *Bacillus* spp. sekundarnih metabolita. Na primer, jedna vrsta *Bacillus* sp. može da sintetiše arsenal različitih lipopeptida, što istovremeno omogućava adaptabilnost, kompetitivnu prednost i efekat na širi spektar biljnih patogena (Balleux et al., 2024). Takođe, pokazano je da lipopeptidi ostvaruju efekat i na biljku, stimulišući njen imunski odgovor (Maksimov et al., 2020).

Radi jednostavnijeg izučavanja i praćenja, mehanizmi su definisani ili kao biokontrolni ili biostimulativni, tako da će navedeni prikaz mehanizama pratiti važeći konsenzus (Compant et al., 2005; Hashem et al., 2019).

1.3.1 Mehanizmi biološke kontrole

Bacillus spp. mogu suzbijati biljne patogene direktnim ili indirektnim mehanizmima (Slika 4). U direktne mehanizme ubrajaju se: antibioza putem produkcije sekundarnih metabolita, ekstracelularnih enzima i isparljivih organskih jedinjenja (eng. *Volatile Organic Compounds* – VOCs), kompeticija za prostor i nutrijente i utišavanje međućelijske komunikacije (eng. *Quorum Quenching* – QQ) (Lahlali et al., 2022). Indirektni mehanizam ostvaruje se indukcijom sistemske otpornosti biljke na patogene (Soni & Keharia, 2021).



Slika 4. Zaštita i poboljšanje rasta biljaka putem direktnih i indirektnih mehanizama biokontrole. Pospešivanje rasta biljaka se takođe može posmatrati i kao indirektni mehanizam biokontrole (slika I. Rosić).

1.3.1.1 Sinteza sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću

Antibiotska aktivnost *Bacillus* spp. je najvećim delom posledica sinteze sekundarnih metabolita: ribozomalno sintetisanih peptida (bakteriocini i bakteriocinima slična inhibitorna jedinjenja - eng. *Bacetrocine-Like Inhibitory Compounds* – BLIS) i neribozomalno sintetisanih lipopeptida, peptida i poliketida (Fira et al., 2018). Bakteriocini i BLIS (amilolizin, amizin, subtilin, subtilozin, turicin) su mali, amfifilni i termostabilni proteini (Darbandi et al., 2022). Uglavnom su specifični za manje grupe filogenetski bliskih bakterija, mada neki pokazuju i širok spektar aktivnosti protiv različitih bakterijskih biljnih patogena. Najčešći mehanizam delovanja bakteriocina i BLIS je ometanje sinteze ćelijskog zida gram-pozitivnih bakterija i narušavanje integriteta ćelijske membrane formiranjem pora (Miljaković et al., 2020). Prva klasifikacija *Bacillus* spp. bakteriocina zasnovana je na postojećoj klasifikaciji bakteriocina bakterija mlečne kiseline (eng. *Lactic-Acid Bacteria* – LAB) (Solis-Balandra & Sanchez-Salas, 2024). Međutim, napredak istraživanja i otkrivanje većeg broja bakteriocina sa međusobno preklapajućim strukturama i funkcijama, otežao je njihovu klasifikaciju u jasno definisane kategorije (Solis-Balandra & Sanchez-Salas, 2024). Danas je široko zastupljena kategorizacija prema bakteriji producentu, pri čemu su bakteriocini uopšteno podeljeni na one koje proizvode gram-pozitivne ili gram-negativne bakterije. Tako da se kod predstavnika roda *Bacillus* mogu razlikovati: bakteriocini klase I

(lantibiotici), najbrojnija klasa kod *Bacillus* spp.; bakteriocini klase II i bakteriocini klase III (kompleksne proteinske termolabilne strukture). Takođe, pojedine klasifikacije bazirane na mehanizmima delovanja i primeni bakteriocina razlikuju još tri klase, od kojih su za rod *Bacillus* značajne: klasa V (tzv. neobični bakteriocini), u koje se ubraja subtilozin i klasa VI (posttranslaciono modifikovani bakteriocini u nastajanju) koji obuhvataju specijalnu kategoriju bakteriocina koje proizvode isključivo *Bacillus* spp. predstavnici, pod nazivom bacilocini (Bahrami et al., 2024). Sama produkcija bakteriocina nije od velikog značaja u biokontroli, zbog usko specifičnog delovanja pretežno na manje zastupljene gram-pozitivne biljne patogene. Kao značajan primer može se izdvojiti uticaj subtilina na fitopatogenu bakteriju *Clavibacter michiganensis* (Gautam et al., 2019).

Mnogo važniju ulogu u biokontroli imaju neribozomalno sintetisani lipopeptidi, peptidi i poliketidi, usled izraženijeg antimikrobnog dejstva na veliki broj bakterijskih i fungalnih biljnih patogena (Karačić et al., 2024). Oni predstavljaju heterogenu grupu jedinjenja, koja u sastavu mogu imati aminokiseline i masne kiseline različitih dužina, uz prisustvo bočnih grupa (metil, acil i glikozil). Najveći broj neribozomalno sintetisanih lipopeptida „*B. subtilis*“ grupe je sintetisan od strane neribozomalne peptidne sintetaze (NRPSs) (Maksimov et al., 2020). Najznačajniju grupu u biokontroli predstavljaju ciklični lipopeptidi, koju čine tri glavne familije: iturini, surfaktini i fengicini. Zahvaljujući amfifilnoj strukturi, ciklični lipopeptidi mogu ostvarivati interakcije sa ćelijskom membranom gljiva i bakterija, na kojoj su zasnovani i mehanizmi njihove antimikrobne aktivnosti. Iako primarni efekat ostvaruju na ćelijsku membranu, pojedini lipopeptidi mogu delovati i intracelularno, vezujući se za nukleinske kiseline i ometajući proces sinteze proteina (Markelova et al., 2025). Predstavnici iturinske porodice (iturin A, C, D i E; mikosubtilin; bacilomicin; bacilopeptini) su heptapeptidi, koji pretežno pokazuju antifungalno dejstvo, formiranjem pora na ćelijskoj membrani, čime narušavaju osmotsku ravnotežu ćelije. Kod pojedinih biokontrolnih sojeva *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* i *B. pumilus* sinteza iturina je opisana kao značajan mehanizam biokontrole *Fusarium* sp. (Santos-Lima et al., 2023). Predstavnici surfaktinske familije (surfaktin, lihenizin, halobacilin, pumilacidin), kako ih sam naziv opisuje, poseduju svojstva surfaktanata, usled čega reaguju sa lipidnim slojem ćelijskih membrana. Pokazuju dozno-zavisni efekat, gde niže koncentracije dovode do formiranja pora u membrani, dok visoke mogu potpuno razoriti ćelijsku membranu (Hassanisaadi et al., 2024). Pored antimikrobnog dejstva, surfaktini su od velikog značaja za kolonizaciju biljnih tkiva, omogućavajući biokontrolnim *Bacillus* spp. sojevima kompetitivnu prednost, usled uloge u povećanju pokretljivosti i formiranju biofilma (Dong et al., 2022). Produkcija surfaktina kod biokontrolnih sojeva *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* i *B. licheniformis* pokazala se kao značajna za suzbijanje široko rasprostranjenih bakterijskih (*Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *C. michiganensis*), i fungalnih fitopatogena (*Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp.) (Marin et al., 2019; Nikolić et al., 2019; Ahmad et al., 2023; Lee et al., 2023; Hussain et al., 2024). Predstavnici familije fengicina (različiti izomeri fengicina, plipastatin, maltacin) su dekaeptidi sa najizraženijim dejstvom na fungalne biljne patogene. Takođe, ostvaruju svoju aktivnost promenom strukture i propustljivosti ćelijske membrane. Vrste *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* su istaknuti producenti fengicina koji doprinose biokontroli gljiva *Verticillium dahliae*, *F. oxysporum* i *Phytophthora parasitica* (Fazle Rabbee et al., 2020; Wang et al., 2022; Iqbal et al., 2024).

Od neribozomalno sintetisanih peptida u biokontroli su značajni bacilizin i mikobacilin detektovani kod predstavnika „*B. subtilis*“ grupe i diketopiperazini, koje sintetišu predstavnici „*B. subtilis*“ i „*B. cereus*“ grupe (Nannan et al., 2020; Bhattacharya et al., 2021).

Poliketidi predstavljaju grupu jedinjenja sintetisanih reakcijama kondenzacije karboksilnih kiselina sa jednim do pet atoma ugljenika katalizovanih enzimom poliketid sintetazom. U biokontroli su opisani efekti difucidina (izolovanog iz *B. velezensis* FZB42) na smanjenje ekspresije gena za virulenciju, ćelijsku deobu i sintezu ćelijskog zida *X. oryzae*, patogena pirinča (Zhou et al., 2023). Takođe, slično dejstvo pokazao je i makrolaktin protiv gram-pozitivnih bakterijskih biljnih patogena, npr. *C. michiganensis* (Karačić et al., 2024). U grupu poliketida ubraja se i bacilen,

specifičan za „*B. subtilis*“ grupu, koji zahvaljujući hibridnoj strukturi poliketida i neribozomalno sintetisanog peptida, ostvaruje efekat i na nivou ćelijske membrane i gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih biljnih patogena i gljiva, kao i na sintezu proteina (Zhang et al., 2023).

1.3.1.2 Sinteza isparljivih organskih jedinjenja

Isparljiva organska jedinjenja predstavljaju heterogenu grupu jedinjenja sintetisanih pri različitim metaboličkim reakcijama, sa glavnom biološkom ulogom u ostvarivanju interakcija između bakterija, gljiva, biljaka i nematoda (Chandrasekaran et al., 2023). Prema fizičko-hemijskim karakteristikama su lipofilna i sa niskom tačkom ključanja, što ih čini isparljivim na sobnoj temperaturi i normalnom atmosferskom pritisku (Costa Almeida, et al., 2023). U brojnim istraživanjima je potvrđena njihova antimikrobna aktivnost protiv bakterijskih i fungalnih biljnih patogena. Prednost ovih isparljivih antimikrobnih agenasa ogleda se u njihovom delovanju u gasovitom agregatnom stanju, čime se prevazilaze prostorna ograničenja koja imaju neisparljivi antimikrobni agensi. Neisparljiva antimikrobna jedinjenja mogu delovati samo na ciljne organizme u njihovoj neposrednoj blizini, dok isparljiva difunduju na dosta veće razdaljine, kroz različite medijume, npr. zemljište (Poulaki & Tjamos, 2023).

Isparljiva organska jedinjenja mogu pripadati različitim klasama hemijskih jedinjenja: alkenima, alkoholima, ketonima, benzenoidima, pirazinima, sulfidima i terpenima. *Bacillus* spp. sojevi najčešće proizvode sledeća isparljiva jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću: alkohole (3-pentanol; 2,3-butandiol; 1,3-propandiol; decil alkohol; 3,5,5-trimetil heksanol), aldehide (nonal, benzaldehid); ketone (2-nonanon; 2-undekanon; acetoin; acetofenon) i benzotiazole (benzotiazol) (Grahovac et al., 2023).

Glavni mehanizam antimikrobnog delovanja isparljivih organskih jedinjenja *Bacillus* spp. je inhibicija ekspresije gena koji kodiraju za osobine i metaboličke puteve odgovorne za virulenciju. Na primer, biokontrolna aktivnost *B. amyloliquefaciens* bazirana na VOCs protiv *R. solanacearum* ostvaruje se inhibicijom pokretljivosti, formiranja biofilma, kolonizacije korena, promena u metabolizmu (smanjenoj sintezi antioksidativnih enzima i egzopolisaharida), kao i u smanjenom intenzitetu translacije (Raza et al., 2016). Takođe, opisan je i mehanizam dejstva VOCs na nivou ćelijske membrane (Xie et al., 2018). VOCs koje proizvode *B. cereus* mogu inhibirati *X. oryzae*, povećavajući ili smanjujući propustljivost ćelijske membrane, što posledično narušava osmotsku ravnotežu ćelije. Ova jedinjenja pokazala su se kao značajna u zaštiti plodova nakon berbe, posebno od fungalnih biljnih patogena, konkretno *Botrytis cinerea* (Wang et al., 2022).

Kao i neisparljiva antimikrobna jedinjenja, i VOCs ostvaruju uspešniji biokontrolni efekat kada deluju zajedno i istovremeno. Takođe se ističe i njihovo sinergističko delovanje sa lipopeptidima. Takođe, VOCs mogu delovati i na samu biljku i ostvarivati biokontrolni efekat indirektno indukcijom sistemske rezistencije, kao i pospešivati rast stimulisanjem sinteze biljnih hormona (giberelina, auksina i citokina) i usvajanjem nutrijenata, pre svega gvožđa (Poulaki & Tjamos, 2023).

1.3.1.3 Produkcija ekstracelularnih enzima

Bacillus spp. su značajni producenti litičkih enzima (hitinaza, glukanaza, celulaza, lipaza, proteaza, amilaza) koji ostvaruju dejstvo hidrolizom ćelijskog zida biljnih patogena (Mishra et al., 2020). Ciljni organizmi ovog mehanizma biokontrolne su fungalni biljni patogeni, usled specifičnosti sastava ćelijskog zida, u kome preovlađuju hitin i glukan. Kao i kod prethodno navedenih antimikrobnih agenasa, sadejstvo različitih litičkih enzima je u osnovi efikasne biokontrolne. Može se istaći aktivnost proteaza, glukanaza, hitinaza i celulaza *B. velezensis* u suzbijanju *B. cinerea* (Toral et al., 2020). Hitinaze hidrolizuju β -1,4-glikozidne veze u hitinu, odnosno poli- β -1,4-N-acetilglukozaminu. Vrste *B. licheniformis* i *B. thuringiensis* istaknuti su kao značajni producenti hitinaza koje deluju na veliki broj fungalni biljnih patogena (*F. culmorum*, *Sclerotia sclerotiorum*,

Guignardia bidwellii i *B. cinerea*) (Gomaa et al., 2012). Celulaze hidrolizuju β -1,4-D-glikozidne veze polisaharida glukana. Sojevi *B. subtilis* pokazali su se efektivni u biokontroli *Colletotrichum gloeosporioides*, upravo zahvaljujući ekskreciji celulaza, zajedno sa glukanzama i hitinazama (Ashwini & Srividya, 2014). Proteaze hidrolizuju peptidne veze između aminokiselina u polipeptidnim lancima. Pored fungalnih biljnih patogena, proteaze su opisane i u biokontroli bakterijskih biljnih patogena. Proteaze *B. amyloliquefaciens* se posebno izdvajaju u suzbijanju *Macrophomina phaseolina*, *F. oxysporum*, *F. semitectum* i *Alternaria alternata* (Ntushelo et al., 2019; Rangel-Montoya et al., 2022), ali i bakterijskog fitopatogena *C. michiganensis* ssp. *michiganensis*, zajedno sa lipazama (Jang et al., 2022).

1.3.1.4 Quorum quenching

Brojni bakterijski biljni patogeni regulišu gustinu svojih populacija i ekspresiju faktora virulencije putem sekrecije, difuzije, i prepoznavanja signalnih molekula autoinducera, u okviru međučelijske komunikacije zavisne od gustine bakterijske populacije (eng. *Quorum Sensing* – QS) (Wu et al., 2020). Na osnovu hemijskog sastava i vrste bakterija producenata razlikuje se nekoliko grupa signalnih molekula: acil-homoserin laktoni (AHL), peptidni autoinduceri, butirlaktoni, kinoloni i difuzibilni signalni faktori (DSF) (Papenfort et al., 2016). Preovlađujući prouzrokovaci bakterijskih oboljenja biljaka su gram-negativne bakterije iz rodova *Pectobacterium*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas* i *Xanthomonas*, kod kojih su sekrecija toksina, hidrolitičkih enzima i formiranje biofilma posredovani molekulima acil-homoserin laktona (Zhu et al., 2023). Slabljenje virulencije ovih patogena moguće je ostvariti inhibicijom međučelijske komunikacije (eng. *Quorum Sensing Inhibition* – QSI), koja se zasniva na interferenciji sa putevima sinteze AHL molekula ili oslobađanjem enzima koji modifikuju ili degraduju AHL molekule (eng. *Quorum Quenching* - QQ) (Naga et al., 2023).

Do sada su identifikovana četiri tipa QQ enzima: laktonaze (hidrolizuju estarsku vezu u laktonskom prstenu), acilaze (hidrolizuju amidnu vezu između laktonskog prstena i acilnog lanca), oksidoreduktaze (modifikuju funkcionalne grupe acilnog niza) i paraoksonaze (hidrolizuju laktonski prsten) (Chen et al., 2013). Među *Bacillus* spp. najzastupljenije su AiiA AHL-laktonaze, visoko konzervisane metalo- β -laktamaze. Prvobitno su opisane kod *B. thuringiensis*, ali se pokazalo da su široko rasprostranjene i u „*B. cereus*“ i „*B. subtilis*“ grupama (Noor et al., 2022). AiiA laktonaze karakteriše konzervisani Zn^{2+} -vezujući domen ($^{104}HXHDXH^{109}$) neophodan za ostvarivanje hidrolitičke aktivnosti enzima (Kim et al., 2005). Nedavno je među predstavnicima roda *Bacillus* (primarno *B. licheniformis*) identifikovana još jedna grupa AHL-laktonaza – YtnP. YtnP laktonaze takođe poseduju strukturne karakteristike superfamilije metalo- β -laktamaza, uključujući i konzervisani HXHXDH motiv. Sa AiiA laktonazama dele i funkcionalne karakteristike - inaktiviraju AHL molekule linearizacijom laktonskog prstena. Međutim, smatra se da AiiA i YtnP laktonaze poseduju različite afinitete za AHL supstrat, u zavisnosti od dužine acilnog lanca (Djokić et al., 2022).

Iako QQ aktivnost *Bacillus* spp. kao mehanizam biokontrole pokazuje veliki potencijal u odnosu na antimikrobna jedinjenja, u smislu manjeg selektivnog pritiska na biljne patogene i sporijeg razvoja rezistentnosti, istraživanja i primena *Bacillus* spp. sa QQ aktivnosti u biokontroli su zanemarena, predstavljajući QQ kao dopunski mehanizam biokontrole (Zhang et al., 2023).

1.3.1.5 Kompeticija za prostor i nutrijente

Kompeticija u biološkoj kontroli se javlja kao posledica preklapanja ekoloških niša između biljnog patogena i biokontrolnog agensa i istovremenih potreba za zajedničkim resursima (prostorom i nutrijentima). Koristeći navedene resurse, biokontrolni *Bacillus* spp. sojevi kolonizuju biljne površine, dovodeći do smanjenja populacije biljnog patogena, posledično štiteći biljku od

bolesti, tako da se sposobnost kolonizacije *Bacillus* spp. sojeva ističe kao preduslov uspešne biokontrolne aktivnosti (Köhl et al., 2019; Lahlali et al., 2022).

Uspešnost kolonizacije pretežno je omogućena sintezom surfaktina, pokretljivošću i formiranjem biofilma. Pored funkcije antimikrobnog agensa, koja direktno vodi smanjenju brojnosti patogena, dejstvo surfaktina na nivou ćelijske membrane, omogućava oslobađanje nutrijenata koje *Bacillus* sp. može koristiti. Takođe, surfaktin je i signalni molekul neophodan u inicijalnim fazama formiranja biofilma (Hafeez et al., 2019).

Sposobnost formiranja biofilma je posebno značajna za primenu biokontrolnih *Bacillus* spp. u filosferi. Strukturna kompleksnost i organizacija bakterijskih zajednica u biofilmovima pospešuje preživljavanje i adaptaciju u nepovoljnim uslovima sredine, posebno izraženim u filosferi. Pre svega, omogućava adheziju i opstanak populacije *Bacillus* spp. pri fluktuirajućoj temperaturi, intenzivnom UV zračenju i maloj koncentraciji vode i nutrijenata (Fessia et al., 2022).

Bakterijski i fungalni biljni patogeni su tokom godina evolucije sa domaćinima, uspeli da razviju adaptacije na specifične ekološke niše biljaka, održavajući svoje populacije u optimalnom broju (Delmas et al., 2016). Širenje populacija patogena može biti onemogućeno upravo defanzivnom strategijom *Bacillus* spp., odnosno formiranjem biofilma koji istovremeno štiti sopstvenu populaciju i ometa adheziju patogena za biljna tkiva (Lyng & Kovács, 2023). Značajan primer biokontrolne *Acidovorax citrulli* je uspešna kolonizacija listova dinje *B. subtilis* sojem, omogućena upravo formiranjem biofilma (Fan et al., 2017).

Bacillus spp. pokazuju dva tipa pokretljivosti posredovane flagelama: plivanje (eng. *swimming*) i rojenje (eng. *swarming*) (Calvio et al., 2005). Pokretljivost tipa plivanja i rojenja je posebno značajna u početnim fazama kolonizacije korena, posebno u vidu hemotaksije, pokrenute sintezom organskih eksudata korena. Pokretljivost omogućava *Bacillus* spp. sojevima bolje iskorišćavanje resursa sredine (npr. kretanje od štetnih molekula koje sintetiše patogeni ili kretanje ka prisutnim hranljivim materijama), kao i širenje dometa antimikrobnih jedinjenja (Gao et al., 2016).

1.3.1.6 Indukcija sistemske rezistencije

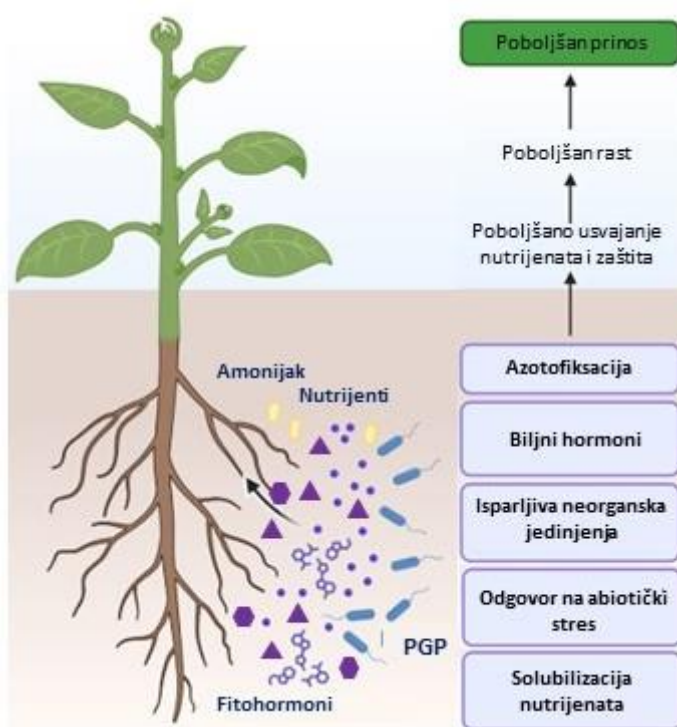
Bacillus spp. mogu ostvariti biokontrolnu aktivnost indirektno, stimulacijom imunskog sistema biljke, koja vodi jačanju otpornosti na patogene. Indukovana sistemska rezistencija (ISR) predstavlja mehanizam odbrane podstaknut spoljašnjim abiotičkim ili biotičkim agensima pre infekcije. ISR je praćena oslobađanjem signalnih molekula koji pokreću ekspresiju gena za različite enzime i hemijska jedinjenja sa preventivnim dejstvom i strukturnim i histološkim promenama u biljci (Samaniego-Gámez et al., 2023).

Prisustvo biokontrolnih *Bacillus* spp. uzrokuje aktiviranje puteva jasmonske kiseline i/ili etilena u biljnim ćelijama nakon prepoznavanja odgovarajućih signala (eng. *Microbe-Associated Molecular Patterns* – MAMP), kao što su flagelin, egzopolisaharidi ćelijskog zida, lipopeptidi i isparljiva organska jedinjenja biokontrolnog agensa. Kao posledica aktivacije ISR, biljka oslobađa antimikrobna jedinjenja (najčešće fenole) i antioksidativne enzime (peroksidaze, fenol-oksidaze, fenilalanin amonijum liaze i superoksid dismutaze) koji doprinose jačanju odbrambenih mehanizama biljke i ograničavanju širenja patogena (Newman et al., 2013). Pored biokontrolne bakterijskih i fungalnih patogena, ISR indukovana *Bacillus* spp. sojevima je značajna i za rezistentnost na virusne infekcije (Zhang et al., 2023).

1.3.2 Mehanizmi pospešivanja rasta biljaka

Bacillus spp. kao biostimulanti pospešuju rast i prinos komercijalno gajenih biljaka za čak 57%, u zavisnosti od biljne kulture, i povećavaju otpornost na biotičke i abiotičke faktore sredine (Kulkova et al., 2023). To postižu direktnim delovanjem na biljke: stimulacijom putem produkcije biljnih hormona (auksina, citokinina, giberelina, abscisinske kiseline) i snabdevanjem biljke

potrebnim nutrijentima solubilizacijom različitih elemenata i fiksacijom azota. Takođe, poboljšavaju otpornost biljke na stresore (sušu, prisustvo teških metala i povećan salinitet zemljišta) (Ali et al., 2023). Kako je mehanizme biološke kontrole i pospešivanja rasta teško razgraničiti u praksi, biološka kontrola se može smatrati i indirektnim mehanizmom pospešivanja rasta biljaka. Upravo suzbijanjem biljnih patogena, podstiče se i rast i prinos biljaka (Stenberg et al., 2021). Aktivnost *Bacillus* spp. u pospešivanju rasta biljaka uglavnom je vezana za njihovu primenu u rizosferi, s obzirom na značaj stimulacije rasta i grananja korena radi efikasnijeg usvajanja nutrijenata (Slika 5). Mada, danas veći broj istraživanja ističe i značaj primene PGP *Bacillus* spp. u filiosferi (Devarajan et al., 2021).



Slika 5. Mehanizmi putem kojih se ostvaruje pospešivanje rasta biljaka (slika I. Rosić).

1.3.2.1 Solubilizacija nutrijenata

Sojevi *Bacillus* spp. omogućavaju prevazilaženje ograničenja u pogledu dostupnosti nutrijenata esencijalnih za biljke, prevodeći nerastvorljive forme elemenata u rastvorljive, koje biljke mogu da usvoje. *Bacillus* spp. su posebno prepoznati u solubilizaciji fosfata, cinka, gvožđa, kalijuma i mangana u zemljištu siromašnom nutrijentima (Kumar et al., 2012).

Veliku količinu fosfatnih veštačkih đubriva biljke ne iskoriste u potpunosti, usled čega dolazi do njegove precipitacije u zemljištu ili dospevanja u vode (Ahmad et al., 2023). U zemljištu su fosfati najviše zastupljeni u formi karbonata i soli gvožđa i aluminijuma (Ducouso-Détrez et al., 2022). Cink i mangan su pretežno „zarobljeni“ u obliku oksida i karbonata, kalijum u različitim glinenim mineralima, a gvožđe u oksidima, hidrosidima i fosfatima. Biljke mogu apsorbovati navedene elemente samo u obliku jona, koji mogu postati dostupni blagim zakišeljavanjem rizosfernog zemljišta organskim kiselinama (limunska, jabučna, oksalatna, ćilibarna, glukonska i mlečna kiselina) koje proizvode *Bacillus* spp. sojevi (El-Fouly et al., 2001). Takođe, produkcijom enzima, npr. fosfataza, *Bacillus* spp. mogu solubilizovati i organska jedinjenja fosfora (Azizoglu et al., 2019).

Gvožđe je u navedenim solima i mineralima u zemljištu pretežno zastupljeno u oksidovanoj trovalentnoj formi, tako da produkcija organskih kiselina nije dovoljna za obezbeđivanje dvovalentnog oblika potrebnog biljkama (Chandwani et al., 2022). Mehanizam kojim PGP *Bacillus* spp. solubilizuju gvožđe je produkcija malih, makrocikličnih molekula, sa izraženim afinitetom za

trovalentno gvožđe – siderofora. Siderofore direktno iz nesolubilnih formi heliraju i dostavljaju gvožđe do specifičnih proteina transportera u ćelijskim membranama korena. Danas su prepoznate tri klase siderofora, pri čemu je za rod *Bacillus* karakteristična produkcija kateholnog tipa (Khan et al., 2016). Pored uloge siderofora i u kompeticiji za nutrijente sa biljnim patogenom, takođe je opisano direktno toksično delovanje na pojedine patogene (Chakraborty et al., 2022). Još jedna značajna uloga siderofora pojedinih *Bacillus* spp. sojeva je i u bioremedijaciji zemljišta kroz vezivanje teških metala, čime ublažavaju uticaj abiotičkog stresa na biljke (Roskova et al., 2022).

1.3.2.2 Povećanje raspoloživosti azotnih jedinjenja

Azot je esencijalni element koji biljke najbolje usvajaju u formi amonijum jona i nitrata, čije je prisustvo u zemljištu izuzetno podložno fluktuacijama (Giordano et al., 2021). Poznato je da pojedine porodice biljka (Fabaceae) mogu ostvarivati simbiotske odnose sa bakterijama azotofiksatorima iz roda *Rhizobium*, u specifičnim strukturama na korenu (nodulama). Sojevi *Bacillus* spp. koji pospešuju rast biljka ne stupaju u takav vid interakcija, ali njihovo prisustvo u rizosferi, ali i u filisferi, može obezbediti dovoljne količine azota (Hashem et al., 2019; Heenan-Daly et al., 2021). Zahvaljujući ekspresiji *nif* gena koji kodiraju esencijalne elemente enzima nitrogenaze, *Bacillus* spp. mogu da vrše konverziju atmosferskog azota u amonijak, koji u prisustvu vode prelazi u amonijum jone (Oliveira et al., 1993). Diazotrofni predstavnici roda *Bacillus* su pretežno vrste koje su, na osnovu filogenetskih i taksonomskih analiza, reklasifikovane u zasebne rodove. Među njima su, na primer, *B. polymyxa* i *B. azotofixans*, koji sada pripadaju rodu *Paenibacillus*, kao i *B. megaterium* koji je reklasifikovan u rod *Priestia*. Međutim, i u sadašnjoj „*B. subtilis*“ grupi su široko zastupljeni diazotrofni predstavnici, o čemu svedoče i brojna istraživanja u kojima je opisan značaj diazotrofnih *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. safensis* i *B. licheniformis* sojeva u pospešivanju rasta biljaka (Yousuf et al., 2017; Jain et al., 2021).

1.3.2.3 Isparljiva neorganska jedinjenja

Iako ne poseduju nitrogenazu, pojedini sojevi roda *Bacillus* mogu doprineti povećanju dostupnosti odgovarajućih formi azota oslobađanjem amonijaka putem alternativnih mehanizama, kao što su amonifikacija nitrita i nitrata, katabolizam aminokiselina i hidroliza uree. Pored opisane uloge, iskoristive forme primarnog nutrijenta, povećano prisustvo amonijaka u zemljištu može sprečavati rast biljnih patogena osetljivih na alkalne uslove (Tiwari et al., 2019; Sagar et al., 2024).

Cijanovodonična kiselina (HCN) je prvobitno smatrana isključivo biokontrolnim agensom sa širokim i neselektivnim dejstvom na brojne fungalne i bakterijske biljne patogene. Međutim, nedavno je pokazano da ne postoji korelacija između količine produkovane HCN i inhibicije rasta biljnih patogena, ukazujući time na indirektno delovanje HCN (Sehrawat et al., 2022). Otkriveno je da HCN formira komplekse sa prelaznim metalima u rizosfernom zemljištu, omogućavajući solubilizaciju raznih elemenata. Najznačajniji primer je obrazovanje kompleksa sa gvožđem, u reakcijama koje indirektno povećavaju dostupnost solubilnih formi fosfora (Rijavec et al., 2016). Sinteza i oslobađanje HCN je pod velikim uticajem faktora sredine, pre svega dostupnog kiseonika, koji u striktno aerobnim uslovima može smanjiti aktivnost enzima u metaboličkim putevima HCN sinteze. Takođe, sinteza HCN nije primarna osobina roda *Bacillus*, ali opisana je među pojedinim sojevima vrsta *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* i *B. cereus* (Blumer & Haas, 2000).

Još jedan značajan gasoviti molekul sa ulogom u pospešivanju rasta biljaka je azot monoksid (NO), koji produkuje veliki broj predstavnika *Bacillus* spp. NO stimuliše ekspresiju gena uključenih u proces sinteze biljnog hormona auksina, sa kojim ostvaruje i sinergističko dejstvo, stimulišući formiranje bočnih korenova i korenskih dlačica. Takođe, moduliše ekspresiju gena značajnih u odgovoru biljke na oksidativni stres, sušu i povišen salinitet zemljišta (Molina-Favero et al., 2007; Sharma et al., 2021).

1.3.2.4 Biljni hormoni

Bacillus spp. sojevi ostvaruju ulogu u pospešivanju rasta biljaka sintezom i razgradnjom biljnih hormona, kao i stimulacijom biljke na produkciju sopstvenih hormona putem sekundarnih metabolita (lipopeptida i VOCs). Pokazana je aktivnost različitih *Bacillus* spp. vrsta u sintezi svih glavnih biljnih hormona: auksina, citokinina, giberelina i abscisinske kiseline (ABA) (Etesami et al., 2023).

Prva otkrivena grupa biljnih hormona, auksini, predstavljaju glavne koordinate rasta i razvoja biljke putem regulacije različitih procesa - uvećanja pojedinačnih ćelija, deobe ćelija, povećanja brojnosti korenskih dlačica i bočnih korenova, fototropizma, geotropizma i apikalne dominacije (Gao et al., 2024). Među auksinima, indol-3-sirćetna kiselina (IAA) je najviše izučavan i rasprostranjen hormon kojeg proizvode PGP *Bacillus* spp., primećen kod svih predstavnika „*B. subtilis*“ grupe i pojedinih *B. cereus* sojeva. Putevi sinteze IAA u ćelijama *Bacillus* jako su slični onima kod biljaka. Glavni prekursor IAA je aminokiselina triptofan, međutim opisani su i putevi sinteze nezavisni od triptofana. Pored uloge biljnog hormona, IAA je značajna kao signalni molekul u komunikaciji između bakterija, i interakciji bakterija i biljaka (Wagi et al., 2019; Poveda et al., 2021).

Sojevi *B. subtilis* i *B. licheniformis* su glavni producenti citokinina. Glavni preduslov za sintezu je prisustvo i ekspresija homologa *ipt* gena za enzim izopenteniltransferazu. Citokinini ostvaruju glavnu ulogu u ćelijskoj deobi, formiranju biljnih organa, sintezi hlorofila i transportu nutrijenata (Wei et al., 2023).

Sinteza giberelina opisana je kod malog broja PGP bakterija, među kojima su značajni *B. pumilus* i *B. licheniformis*, koji proizvode četiri tipa giberelina. Primarni efekat giberelina je izduživanje stabla, a opisane su i uloge u klijanju i razviću cvetova i plodova. U ovim procesima, primena PGP koji sintetišu gibereline može omogućiti prevazilaženje neophodnih temperaturnih i svetlosnih stimulusa (Radhakrishnan et al., 2016).

Sojevi *B. pumilus*, *B. licheniformis* i *B. amyloliquefaciens* su najpoznatiji ABA producenti (Timofeeva et al., 2024). Glavna uloga ABA je regulacija odgovora biljke na različite stresne faktore, poput suše, povišenog saliniteta, niskih i visokih temperatura, kao i u senescenciji.

1.3.2.5 Odgovor na abiotički stres

Među najznačajnije abiotičke faktore koji negativno utiču na rast i prinos biljaka ubrajaju se suša, povišen salinitet zemljišta i zagađenje zemljišta teškim metalima. Primena PGP *Bacillus* spp. sojeva omogućava ublažavanje efekata abiotičkog stresa putem kombinacije različitih mehanizama, oslobađanja biljnih hormona, enzima, ekstracelularnih polisaharida, antioksidanasa, osmolita i VOCs (Mellidou et al., 2022). Biljke na stresne uslove reaguju produkcijom hormona stresa, etilena i ABA, koji pokreću odgovor biljke na stres, omogućavajući njegovo prevazilaženje ukoliko je izloženost stresnim uslovima kratkotrajna. Međutim, pri većoj koncentraciji i dužem delovanju hormona stresa, dolazi do inhibicije rasta biljke, sušenja i opadanja listova i atrofije korenovog sistema (Müller, 2021).

Mehanizam kojim većina predstavnika iz „*B. subtilis*“ grupe reguliše nivo etilena je interferencijom sa putem sinteze etilena od prekursora 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC). Taj mehanizam, posebno značajan u prevazilaženju sušnih uslova, zasniva se na razgradnji ACC-a ACC deaminazom, čime se smanjuje dostupnost prekursora etilena, pa samim tim se i njegova koncentracija održava na niskom nivou (Shahid et al., 2023).

Kao odgovor na visoke koncentracije soli, pre svega natrijum hlorida i različitih jona (bikarbonata, kalcijuma, magnezijuma, sulfata), opisana je uloga VOCs *B. amyloliquefaciens* u stimulaciji biljke na sintezu antioksidanasa, osmoprotektanata i hormona citokina i auksina (Luo et al., 2022).

Zaštitu od teških metala u zemljištu PGP *Bacillus* spp. najčešće ostvaruju oslobađanjem siderofora koje vezuju metale poput kadmijuma, hroma i olova i njihovim usvajanjem, kao i precipitacijom teških metala produkcijom kiselina i baza, čime sprečavaju biljke u usvajanju ovih elemenata (Efe et al., 2022).

1.4 Izazovi u primeni *Bacillus* spp. u zaštiti biljaka

Iako istraživanja primene *Bacillus* spp. u biokontroli i pospešivanju rasta biljaka traju gotovo čitav vek, preparati na bazi *Bacillus* spp. sojeva su i dalje daleko ispod hemijskih pesticida i fertilizatora po zastupljenosti na svetskom tržištu, popularnosti i izboru krajnjih korisnika (Serrão et al., 2024). Pre nego što biokontrolni i PGP sojevi mogu biti primenjeni, neophodno ih je najpre izolovati, identifikovati i temeljno fenotipski i genotipski okarakterisati, kako bi se procenila bezbednost njihove primene po zdravlje ljudi i životnu sredinu. Zatim je neophodno ispitati i potvrditi biokontrolnu i/ili PGP aktivnost kroz seriju testova, prvo *in vitro* i *in planta* u kontrolisanim uslovima, a potom i u realnim poljskim uslovima. Sledeći korak podrazumeva optimizaciju, testiranje i standardizaciju biotehnološkog proces proizvodnje i formulacije preparata, baziranog na odabranom *Bacillus* spp. soju. Pri tome je ključno obezbediti stabilnost i aktivnost soja, koja će biti očuvana tokom dužeg vremenskog perioda, uz ekonomičnu cenu proizvodnje i jednostavnost primene. Na kraju sledi dugotrajan i skup proces registracije preparata, koji je često praćen neizvesnim ishodom zbog nepostojanja međunarodnog regulatornog tela i razlika u zakonskim ograničenjima pojedinačnih država. Čak i nakon uspešnog razvoja, preparati na bazi ovih sojeva se na tržištu suočavaju sa jakom konkurencijom stabilnijih i pouzdanijih hemijskih preparata sa očekivanim uspešnim ishodom u suzbijanju patogena (Schisler et al., 2004; Strauch et al., 2011; Nihorimbere et al., 2024; Vasques et al., 2024).

Na svakom koraku prikazane procedure mogu se javiti potencijalni problemi. Međutim, prioritet i izazov za nauku predstavlja premošćavanje jaza između efektivnosti i efikasnosti *Bacillus* spp. u kontrolisanim laboratorijskim uslovima i višestruko slabijih rezultata u testovima u polju (Akinsemolu et al., 2024). Novootkriveni soj u laboratorijskim uslovima može pokazati izuzetnu biokontrolnu/PGP aktivnost, visoku brojnost populacije, kompetitivnost sa patogenom i komplementarnost sa biljkom i njenom mikrobiotom, dok usko grlo za nastavak procedure razvijanja preparata predstavlja upravo primena u realnim uslovima. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je najveće ograničenje uspešnosti biokontrolnog/PGP soja pitanje preživljavanja, adaptacije i kolonizacije biljne niše u kojoj je primenjen, a ne izostanak aktivnosti (Weng et al., 2013; Zhang et al., 2023). S toga je neophodno ispitivanje interakcija između četiri biološka aktera (biljke, mikrobiote, biljnog patogena i biokontrolnog/PGP soja) postaviti u okvir geografskih faktora područja u kome se soj primenjuje, kao i uticaja mikroklimе (npr. prosečne temperature i temperaturnih fluktuacija, vlažnosti vazduha, dužini i intenzitetu UV zračenja, tipu zemljišta).

Posebno izazovnu sredinu predstavlja filosfera biljaka, usled velike potrebe za razvojem biokontrolnog preparata koji bi efiksano suzbijao folijarne patogene.

1.5 *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* kao folijarni patogen šećerne repe

Jedan od najznačajnijih i najčešćih bakterijskih patogena filosfere je *P. syringae*, kompleks vrsta za koje je poznato da mogu inficirati preko 200 vrsta biljaka, od kojih su mnoge industrijski važne. Tokom koevolucije sa biljkama, ovaj fitopatogen je razvio adaptacije na život u specifičnim uslovima u filosferi, kao na primer životni ciklus koji se sastoji od epifitne i endofitne faze (Xin et al., 2018). Pored toga, infekciju karakteriše brzo širenje, povezano sa ciklusom kruženja vode i opstankom *P. syringae* u atmosferi i vodenim sistemima (Morris et al., 2008).

U Srbiji je interesovanje za kontrolu i tretman ovog bakterijskog biljnog patogena probuđeno nakon prve velike epidemije *P. syringae* pv. *aptata* u komercijalnim usevim šećerne repe (*Beta vulgaris*) u Vojvodini 2013. godine (Stojšin et al., 2015). Šećerna repa predstavlja veoma

značajnu biljnu kulturu za privredu Srbije, čiji usevi obuhvataju površinu i do 48 000 ha, pretežno u Vojvodini. Prosečna godišnja proizvodnja sirove šećerne repe u Srbiji doseže više od dva miliona tona ili 220 000 t njenog glavnog produkta, saharoze (Republički zavod za statistiku, 2024). Klimatski uslovi u Vojvodini, sa prosečnom vlažnošću vazduha između 60-80% i temperaturama od 15-25 °C u proleće i rano leto, pogoduju zadržavanju vlage na izniklim, mladim biljkama šećerne repe (Republički hidrometeorološki zavod, n.d.). Zadržavanju vlage, pored povećane količine padavina i rose u ovom periodu, doprinosi i standardni sistem navodnjavanja ratarskih biljaka rasprskivačima (Rai et al., 2017). Takvi uslovi pogoduju razvoju i širenju infekcije izazvane *P. syringae*, na koju su posebno osetljive mlade biljke (Hu et al., 2019). Takođe, propusti u prepoznavanju simptoma na listovima, koji se lako mogu pogrešno dijagnostifikovati kao simptomi izazvani mnogo češćim fungalnim patogenima poput *Cercospora beticola* i *Pleospora betae* (Botrel et al., 2018; Nikolić et al., 2019), potpomoglo je neblagovremenom reagovanju i širenju epidemije *P. syringae*. *P. syringae* pv. *aptata* je tokom koevolucije sa biljkama razvio jako dobre adaptivne mehanizme za preživljavanje nepovoljnih uslova u filozofiji. Karakterističan je životni ciklus koga čine dve faze: epifitna i endofitna. Tokom epifitne faze cilj *P. syringae* pv. *aptata* je uspešna kolonizacija listova i mladih stabala, širenje na dostupne biljke i preživljavanje do povoljne prilike za prodor u biljna tkiva i prelaza u endofitnu fazu. Preživljavanje pri teškim abiotičkim faktorima filozofije omogućeno je: prisustvom pigmentata i mehanizama reparacije koji štite od UV zračenja i oksidativnog stresa, produkcijom egzopolisaharida koji štite od desikacije i omogućavaju adheziju za biljne površine, korišćenjem biljnih eksudata kao nutrijenata i kretanjem ka povoljnijim mikronišama pomoću flagela (Xin et al., 2018). Kroz stome otvorene pri vlažnim uslovima, stalno otvorene hidatode i mehaničke povrede, *P. syringae* pv. *aptata* ulazi u biljno tkivo i započinje intenzivno razmnožavanje u apoplastu, produkujući različite faktore virulencije (toksine, enzime i efektore) koji suprimiraju imunski sistem biljke i izazivaju vidljive simptome infekcije (Tarkowski & Verecke, 2014). Simptomi se uočavaju prvo kao vodene lezije (eng. *water-soaked symptoms*), koje prelaze u braon pege sa tamnim marginama, napredujući do nekroze, deformacije i uvenuća kotiledona i listova (Stojšin et al., 2015).

Kako bi biokontrolni *Bacillus* spp. soj uspešno suzbio ovakvog patogena pri nepovoljnim abiotičkim faktorima, neophodno je da ostvari dejstvo u kritičnoj fazi njegovog životnog ciklusa. Na primeru *P. syringae*, prelazak iz epifitne u endofitnu fazu bi mogao da predstavlja okvir u kome bi mehanizmi *Bacillus* spp., kao što je kompeticija za prostor i nutrijente, osnažena produkcijom antimikrobnih agenasa, omogućili uspešnu kolonizaciju filozofije. Preduslov za dostizanje i održavanje stabilne *Bacillus* spp. populacije tokom vremena podrazumevao bi odgovore na niske koncentracije nutrijenata (npr. produkcija siderofora), fleksibilnost u pogledu izvora ugljenika (sinteza indol-3-sirćetne kiseline), nisku vodenu aktivnost (formiranje biofilma), visok intenzitet UV zračenja (mehanizmi reparacije DNK i antoksidansi) i interakcije sa imunskim sistemom biljke (indukcija sistemske rezistencije) (Legein et al., 2020). Pored toga, dodatna istraživanja koja bi obuhvatala identifikaciju i praćenje ekspresije gena za značajne osobine, analizu transkriptoma biljke i njene mikrobiote, fenotipske testove, analizu metaboloma, mogla bi da omoguće bolje razumevanje fundamentalnih mehanizama, kojima biokontrolni i PGP *Bacillus* spp. sojevi ostvaruju svoj efekat (Aguiar-Pulido et al., 2016). Takođe, neophodno je istaći značaj optimizacije metoda za precizno praćenje i kvantifikaciju biokontrolnih/PGP sojeva primenjenih na biljke, kako bi se ispitala sposobnost preživljavanja i kolonizacije pri datim biotičkim i abiotičkim faktorima i omogućila selekcija uspešnih sojeva (He et al., 2021).

2. CILJEVI

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su ispitivanje sposobnosti *Bacillus* spp. sojeva za uspješnu kolonizaciju filofere, rasvetljavanje mehanizama pospešivanja rasta biljke domaćina, kao i biokontrole lisne pegavosti šećerne repe, što je ostvareno kroz:

1. Razvijanje soj-specifičnih prajmera za praćenje i detekciju odabranih biokontrolnih *Bacillus* spp. sojeva;
2. Kvantifikacija odabranog biokontrolnog *Bacillus* spp. soja u filoferi šećerne repe i ispitivanje potencijala u kolonizaciji i biokontroli lisne pegavosti *in planta*;
3. Precizna identifikacija i utvrđivanje filogenetskog položaja odabranog *Bacillus* spp. soja;
4. Utvrđivanje repertoara gena uključenih u biokontrolne i PGP aktivnosti, uključujući i gene za: kolonizaciju biljaka (pokretljivost, formiranje biofilma, produkciju surfaktina), produkciju ekstracelularnih enzima i *quorum quenching* aktivnost, adaptaciju na uslove u filoferi (otpornost na UV zračenje, isušivanje, alternativne metaboličke puteve) i sintezu potencijalno novih antimikrobnih jedinjenja;
5. *In vitro* ispitivanje osobina odabranog *Bacillus* spp. soja značajnog za kolonizaciju, biokontrolu i pospešivanje rasta biljaka.

3. MATERIЈAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Sojevi bakterija

U ovom radu korišćena je kolekcija Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, od 251 *Bacillus* spp. izolata, izolovanih iz uzoraka zemljišta (153 izolata), sena i slame (34 izolata) i stajskog đubriva (64 izolata) sakupljenih u različitim regionima Srbije. Svi izolati su morfološki okarakterisani i preliminarno identifikovani bojenjem po Gramu i katalaza testom (Stanković, 2003; Berić, 2010). Kolekcija sadrži sojeve čija je biokontrolna aktivnost *in vitro* pokazana u prethodnim istraživanjima (Dimkić et al., 2013, Dimkić et al., 2015; Dimkić et al., 2017; Nikolić et al., 2019; Marković et al., 2023).

Takođe, korišćena su i dva soja iz kolekcije izolata *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* izolovanih sa komercijalnih useva šećerne repe u Vojvodini (Nikolić, 2018). Sojevi su odabrani na osnovu razlike u intenzitetu simptoma lisne pegavosti šećerne repe: *P. syringae* pv. *aptata* P21 (visoko virulentan) i *P. syringae* pv. *aptata* P17 (slabo virulentan).

Genetički modifikovane kompetentne ćelije soja *Escherichia coli* DH5a korišćene su u eksperimentima transformacije i kloniranja.

Mutantni soj *Chromobacterium violaceum* CV026 korišćen je kao biosenzor za detekciju acil-homoserin laktona (AHL) u *quorum quenching* testu.

3.2 Medijumi za gajenje bakterija

Luria-Bertani bujon (LB)

| | |
|-------------------|---------|
| Kazein hidrolizat | 10 g |
| Ekstrakt kvasca | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Luria-Bertani agar (LA)

| | |
|----------------------|--------|
| LB sa dodatkom agara | 15 g/l |
|----------------------|--------|

Luria-Bertani soft agar (LA-soft)

| | |
|----------------------|-------|
| LB sa dodatkom agara | 7 g/l |
|----------------------|-------|

Kingov bujon B (eng. *King's Medium B Broth - KB*), TMMedia, India

| | |
|----------------------|---------|
| KB | 23 g |
| Glicerol | 15 ml |
| dH ₂ O do | 1000 ml |

Kingov agar B (eng. *King's Medium B Base - KB*), TMMedia, India

| | |
|----------------------|---------|
| KB | 43 g |
| Glicerol | 15 ml |
| dH ₂ O do | 1000 ml |

Hranljivi bujon (eng. *Nutrient Broth, NB*), TMMedia, India

| | |
|-------------------|---------|
| NB | 13 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Hranljivi agar (NA)

| | |
|--------------------------------------|--------|
| NB sa dodatkom agara u koncentraciji | 15 g/l |
|--------------------------------------|--------|

Hranljivi agar sa 5% saharoze (NAS)

| | |
|-------------------|---------|
| Hranjivi bujon E | 13 g |
| Saharoza | 50 g |
| Agar | 15 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Tripton-soja bujon (TSB), TMMedia, India

| | |
|-------------------|---------|
| TSB | 31,5 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Tripton-soja agar (TSA), TMMedia, India

| | |
|-----------------------|--------|
| TSB sa dodatkom agara | 15 g/l |
|-----------------------|--------|

4% peptonska voda, HiMedia, India

| | |
|-------------------|---------|
| Peptonska voda | 40 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Chromogenic *Bacillus* agar, TMMedia, India

| | |
|---------------------|---------|
| BCA | 49,22 g |
| Polimiksin B sulfat | 2 ml |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Pikovskaja agar (PA), TMMedia, India

| | |
|-------------------|---------|
| PA | 31,3 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Aleksandrov agar (AA), TMMedia, India

| | |
|-------------------|---------|
| AA | 29,6 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Medijum za praćenje solubilizacije cinka iz soli ZnO i ZnSO₄

| | |
|---|--------|
| D-glukoza | 10g |
| Tris-HCl | 6,06 g |
| NaCl | 4,68 g |
| KCl | 1,49 g |
| NH ₄ Cl | 1,07 g |
| Na ₂ SO ₄ | 0,43 g |
| MgCl ² × 2 H ² O | 0,2 g |
| CaCl ² × 2 H ² O | 0,03 g |
| 0,1% vodeni rastvor ZnO ili ZnSO ₄ | 100 ml |
| Agar | 15 g |
| dH ₂ O | 900 ml |

Medijum za praćenje solubilizacije mangana iz soli MnO₂, MnCl₂ i MnSO₄

| | |
|-------------------|---------|
| NB | 13 g |
| MnO ₂ | 0,71 g |
| ili | |
| MnCl ₂ | 1,25 g |
| ili | |
| MnSO ₄ | 1,51 g |
| Agar | 15 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Hrom-azurol S agar (eng. *Chrome Azurol S, CAS*)

| | |
|------------------------------|---------|
| Rastvor 1: FeCl ₃ | 9 ml |
| HDTMA | 40 ml |
| CAS | 50 ml |
| Rastvor 2: PIPES (pH 6) | 30,24 g |
| dH ₂ O | 750 ml |
| Agar | 15 g |
| dH ₂ O do | 1000 ml |

Podloga za praćenje kretanja tipa rojenja (eng. *Swarming motility assay*)

| | |
|-----------------------------|------|
| LA ili KB sa dodatkom agara | 0,4% |
|-----------------------------|------|

Podloga za praćenje kretanja tipa plivanja (eng. *Swimming motility assay*)

| | |
|---------------------------------|-------|
| 50% LA ili KB sa dodatkom agara | 0,25% |
|---------------------------------|-------|

3.3 Rastvori i reagensi**TE pufer, pH 7,6**

| | |
|-------------------|---------|
| 10 mM TRIS | 0,036 g |
| 0,5 mM EDTA | 60 µl |
| dH ₂ O | 30 ml |

3% CTAB (heksadecil trimetil amonijum bromid), pH 8

| | |
|-------------------|----------|
| CTAB | 30 g |
| 1M TRIS | 121,14 g |
| 1,4M NaCl | 81,816 g |
| 0,5 mM EDTA | 40 ml |
| dH ₂ O | 1000 ml |

5 × TBE, pH 8,0

| | |
|-------------------|---------|
| 0,5 M EDTA | 10 ml |
| 50 mM TRIS | 54,48 g |
| Borna kiselina | 27 g |
| dH ₂ O | 1000 ml |

Rastvor FeCl₃

| | |
|---------------------------------------|----------|
| FeCl ₃ × 6H ₂ O | 0,0027 g |
| 12 M HCl | 8,3 µl |
| dH ₂ O | 10 ml |

Rastvor HDTMA

| | |
|-------------------|---------|
| HDTMA | 0,073 g |
| dH ₂ O | 40 ml |

Rastvor CAS

| | |
|-------------------|---------|
| CAS | 0,065 g |
| dH ₂ O | 50 ml |

Salkovski reagens

0,5 M FeCl₃ u 35% HClO₄

Neslerov reagens

| | |
|-----------------------------|-------|
| 0,05 g/ml HgCl ₂ | 50 ml |
| 0,1 g/ml KCl | 50 ml |
| 10 g/ml NaOH | 10 ml |

Boja za nalivanje PCR produkata (eng. *Gel-loading dye*)

| | |
|-------------------|--------|
| Brom-fenol plavo | 0,25 g |
| 50% glicerol | 6 ml |
| dH ₂ O | 4 ml |

3.4 Genetičko profilisanje i procena diverziteta *Bacillus* spp. kolekcije

Izolacija genomske DNK (gDNK) iz 251 *Bacillus* spp. izolata je izvedena na osnovu Le Marrec et al. (2000) protokola modifikovanog za gram-pozitivne bakterije. Izolacija je rađena iz čistih kultura *Bacillus* spp. izolata odgajenih na LA medijumu, uz inkubaciju na 30 °C, nakon 24 h. Pojedinačne kolonije su resuspendovane u TE puferu sa dodatkom lizozima u finalnoj koncentraciji 200 µg/ i inkubirane 30 min na 37 °C. U lizat je dodato 100 µl 5 M NaCl i 300 µl 3% CTAB pufera. Nakon inkubacije na 65 °C, u trajanju od 20 min, dodato je 800 µl hloroforma i smeša je centrifugirana na 13000 rpm, 15 min. Gornja faza je prebačena u tubice od 1,5 ml i pomešana sa 1/10 zapremine 3 M natrijum-acetata (pH 5) i jednakom zapreminom ledeno-hladnog izopropanola. Nakon centrifugiranja (13000 rpm, 15 min), talog DNK je ispran sa 1 ml 96% ledeno-hladnog etanola. Uzorci su centrifugirani (13000 rpm, 10 min), talog DNK je osušen na 37 °C i resuspendovan u 50 µl TE pufera. Koncentracije uzoraka izolovanih DNK izmerene su spektrofotometrijski (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, SAD) i ujednačene na koncentraciju od 50 ng/µl. Uzorci su skladišteni na -20 °C.

U genetičkom profilisanju 251 *Bacillus* spp. izolata korišćena su četiri rep (eng. *Repetitive Extragenic Palindromic*) prajmera i deset RAPD (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA*) prajmera (Tabela 1). Sve reakcije su rađene u zapremini od 25 µl.

Reakcione smeše za BOX (BOX A subjedinica BOX elementa *Streptococcus pneumoniae*) i (GTG)₅ -PCR sastojale su se od: 10 µl OneTaq Quick-Load 2 × Master Mix sa standardnim puferom (NEB, SAD), 1,5 µl prajmera (10 µM), 7,5 µl PCR vode (DNase/RNase free water, Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD) i 1 µl gDNK (konc. 50 ng/µl).

Reakciona smeša za REP-PCR sastojala se od: 2 µl 10 × KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems Inc, SAD), 1,2 µl MgCl₂ (25 mM); 0,4 µl smeše dezoksiribonukleotida (dNTP mix, 2,5 mM svakog nukleotida), 1,5 µl prajmera (10 µM), 12,25 µl PCR vode, 0,15 µl KAPA Taq polimeraze (5 U/µl, KAPA Biosystems Inc, SAD) i 1 µl gDNK (konc. 50 ng/µl).

Reakciona smeša za ERIC (eng. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) -PCR sastojala se od: 2,5 µl 10 × KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems Inc, SAD), 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP mix (2,5 mM svakog nukleotida), 1,9 µl prajmera (10 µM), 15,6 µl PCR vode, 0,1 µl KAPA Taq polimeraze (5 U/µl, KAPA Biosystems Inc, SAD) i 1 µl gDNK (konc. 50 ng/µl).

Reakcione smeše za RAPD272- i RAPD208-PCR sastojale su se od: 2,5 µl 10 × KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems Inc, SAD), 2,3 µl MgCl₂ (25 mM), 0,63 µl dNTP mix (2,5 mM svakog nukleotida), 1,9 µl prajmera (10 µM), 16,6 µl PCR vode, 0,1 µl KAPA Taq polimeraze (5 U/µl, KAPA Biosystems Inc, SAD) i 1 µl gDNK (konc. 50 ng/µl).

Reakciona smeša za M13-PCR sastojala se od: 2,5 µl 10 × KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems Inc, SAD), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP mix (2,5 mM svakog nukleotida), 1,9 µl prajmera (10 µM), 17,45 µl PCR vode, 0,15 µl KAPA Taq polimeraze (5 U/µl, KAPA Biosystems Inc, SAD) i 1 µl gDNK (konc. 50 ng/µl).

Reakcione smeše za OPO02-, OPG5- i OPB07-PCR sastojale su se od: 2,5 µl 10 × KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems Inc, SAD), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl dNTP mix (2,5 mM svakog

nukleotida), 2 μ l prajmera (10 μ M), 15,85 μ l PCR vode, 0,15 μ l KAPA Taq polimeraze (5 U/ μ l, KAPA Biosystems Inc, SAD) i 1 μ l gDNK (konc. 50 ng/ μ l).

Reakcione smeše za OPG1- i OPG6-PCR sastojale su se od: 2,5 μ l 10 \times KAPA Taq pufera (KAPA Biosystems Inc, SAD), 2,5 μ l MgCl₂ (25 mM), 2 μ l dNTP mix (2,5 mM svakog nukleotida), 1 μ l prajmera (10 μ M), 15,87 μ l PCR vode, 0,125 μ l KAPA Taq polimeraze (5 U/ μ l, KAPA Biosystems Inc, SAD) i 1 μ l gDNK (konc. 50 ng/ μ l).

Reakcione smeše za RAPD1247- i RF2-PCR sastojale su se od: 10 μ l OneTaq Quick-Load 2 \times Master Mix sa standardnim puferom (NEB, SAD), 2 μ l prajmera (10 μ M), 7 μ l PCR vode i 1 μ l gDNK (konc. 50 ng/ μ l).

Umnožavanja DNK vršeno je u PCR MiniAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD) aparatu pri optimizovanim uslovima datim u Tabeli 1.

PCR produkti (5 μ l) pomešani sa bojom za nalivanje (1,5 μ l) razdvojeni su elektroforezom na 1% agaroznim gelovima u 0,5 \times TBE puferu. Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 90 V i jačini struje od 300 mA, u trajanju od 90 min. PCR produkti su vizuelizovani pod UV svetlom transiluminatora (LKB, Transilluminator 2011 Macrovue UV Light, Sweden) i fotografisani radi dalje analize.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni u genetičkom profilisanju *Bacillus* spp. kolekcije i uslovi PCR reakcija pod kojim su se odvijala umnožavanja nasumičnih i repetitivnih sekvenci genoma. „X” u sekvenci REP prajmera predstavlja inozin.

| Prajmeri | Sekvence parjmera (5'-3') | Uslovi PCR reakcija | | | | | | Referenca |
|--------------------|---------------------------|-------------------------|--------------|---------------|------------|--------------|--------------------|--------------------------------|
| | | Inicijalna denaturacija | Denaturacija | Hibridizacija | Elongacija | Broj ciklusa | Finalna elongacija | |
| BOX-A1R | CTACGGCAAGGCGACGCTGACG | 95 °C | 94 °C | 52 °C | 65 °C | 30 | 65 °C | Allipi and Aguilar (1998) |
| ERIC 1R | ATGTAAGCTCCTGGGGAT | 7 min | 1 min | 1 min | 8 min | | 16 min | Freitas et al. (2008) |
| ERIC 2 | AAGTAAGTGACTGGGGTG | | | | | | | |
| (GTG) ₅ | GTGGTGGTGGTGGTG | 94 °C | 94 °C | 45 °C | 72 °C | 35 | 72 °C | Versalovic et al. (1998) |
| | | 5 min | 30 s | 1 min | 1 min | | 7 min | |
| REP1-R-I | XXXXCGXCGXCATCXGGC | 95 °C | 94 °C | 40 °C | 65 °C | 35 | 65 °C | Gormez et al. (2012) |
| REP-2-I | XCGXCTTATCXGGCCTAC | 7 min | 1 min | 1 min | 1 min | | 11 min | |
| RAPD272 | AGCGGGCCAA | 94 °C | 94 °C | 35 °C | 72 °C | 35 | 72 °C | Hematzadeh and Haghkhah (2021) |
| RAPD208 | ACGGCCGACC | 2 min | 30 s | 30 s | 2 min | | 10 min | |
| M13 | GAGGGTGGCGGTTCT | 95 °C | 94 °C | 40 °C | 72 °C | 35 | 72 °C | Stefańska et al. (2022) |
| | | 5 min | 1 min | 20 s | 2 min | | 5 min | |
| OPO 02 | ACGTAGCGTC | 94 °C | 94 °C | 35 °C | 72 °C | 45 | 72 °C | Khowal et al. (2017) |
| OPB 07 | GGTGACGCAG | 1 min | 1 min | 30 s | 1 min | | 3 min | |
| OPG 5 | CTGAGACGGA | 94 °C | 94 °C | 36 °C | 72 °C | 30 | 72 °C | Felici et al. (2008) |
| | | 4 min | 1 min | 1 min | 30 s | | 5 min | |
| OPG 1 | CTACGGAGGA | 94 °C | 94 °C | 35 °C | 72 °C | 35 | 72 °C | Dias et al. (1998) |
| OPG 6 | GTGCCTAACC | 5 min | 30 s | 45 s | 1 min 40s | | 7 min | |
| RAPD 1247 | AAGAGCCCGT | 94 °C | 94 °C | 36 °C | 72 °C | 30 | 72 °C | Gallori et al. (1998) |
| RF2 | CGGCCCTGT | 1 min | 1 min | 1 min | 2 min | | 10 min | |

Položaj umnoženih fragmenata DNK koji čine genetičke profile *Bacillus* spp. izolata na gelovima analizirane su u GelAnalyzer 19.1 softveru (Lazar & Lazar, www.gelanalyzer.com, 2022). Kao molekularni marker za procenjivanje veličine DNK fragmenata korišćen je FastGene 1 kb (100 bp-10 000 bp) DNA Marker Plus (Nippon Genetics, Japan). Položaj traka je konvertovan u binarni matriks, u kome „1” označava postojanje trake na određenoj poziciji, a „0” njen izostanak. Dobijeni matriks je analiziran primenom formule za izračunavanje indeksa polimorfizma (Bardakci & Skibinski, 1994), modifikovane i adaptirane za primenu na prokariotskim genomima:

$$P_{xy} = n_{xy} / (n_x + n_y) .$$

U navedenoj formuli n_{xy} predstavlja broj polimorfni traka između izolata x i y, dok n_x i n_y označavaju ukupan broj traka po izolatu. Procenjen polimorfizam sa odgovarajućim prajmerima predstavljen je kroz srednju vrednost P_{xy} svih izolata čiji su genetički profili poređeni. Kako bi se potvrdila uspešnost svakog prajmera u razlikovanju genotipova izolata, izračunat je diskriminacioni indeks (D) prajmera, odnosno verovatnoća da će za dva nasumično izabrana izolata metoda pokazati isti genotip, na osnovu formule date u Hunter and Gaston (1988). Isti genetički profili organizovani su u klastere unutar dendrograma primenom UPGMA (eng. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) metode u CLIQS 1D softveru (TotalLab, UK).

Uspešnost svakog prajmera u genetičkom profilisanju *Bacillus* spp. izolata određena je na osnovu sledećih parametara: (1) ukupan broj traka; (2) raspon veličina dobijenih traka; (3) broj različitih genetičkih profila; (4) indeks polimorfizma (P_{xy}); (5) diskriminacioni indeks (D); (6) broj jedinstvenih traka dobijenih odgovarajućim prajmerom.

3.5 Dizajn RAPD-SCAR prajmera za ddPCR

3.5.1 Kloniranje i sekvenciranje jedinstvenih RAPD amplikona

Na osnovu analize položaja traka na gelovima nakon umnožavanja DNK različitim prajmerima, detektovane su tri jedinstvene trake, kod tri biokontrolna izolata iz zemljišta. Jedinstvene trake su isečene iz agaroznog gela i prečišćene ZymoClean Gel DNA Recovery (Zymo Research, SAD) kitom.

Reakcija ligacije prečišćenih traka u vektor urađena je prema protokolu za pGEM-T Easy Vector System II (Promega, SAD). Tri ligacione smeše zapremina 10 μ l sastojale su se od sledećih komponenti: 5 μ l pufera za ligaciju (2 \times Rapid Ligation Buffer T4 DNA ligase), 1 μ l pre-linearizovanog vektora (pGEM-T Easy), 1 μ l T4 DNK ligaze, prečišćene DNK (inserta) zapremine izračunate prema formuli i PCR vode. Zapremine inserta preračunate su na osnovu formule date u protokolu za ligaciju, sa odnosom inserta i vektora 3:1:

$$\frac{\text{masa vektora (ng)} \cdot \text{veličina inserta (kb)}}{\text{veličina vektora (kb)}} * \frac{3}{1} .$$

Dobijene vrednosti su zatim podeljene sa izmerenim koncentracijama DNK inserta. U pozitivnoj kontroli ligacije, umesto DNK prečišćenih traka, dodata je kontrolna DNK (Promega, SAD), a u negativnoj kontroli PCR voda. Ligacione smeše su inkubirane preko noći na 4 °C.

Modifikovan hemijski metod indukcije kompetencije kalcijum-hloridom (Mandel & Higa, 1970) primenjen je na *E. coli* DH5 α ćelije kako bi se obezbedila njihova transformacija toplotnim šokom. Ukratko, 750 μ l prekonocne kulture *E. coli* DH5 α dodato je u 65 ml LB medijuma i gajeno do optičke gustine (OD) 0,5. Bakterijska kultura je centrifugirana (5000 \times g, 10 min, na 4 °C), talog resuspendovan u hladnom, sterilnom 0,1 M CaCl₂ i inkubiran 30 min na ledu. Nakon centrifugiranja pod istim uslovima, talog je ponovno resuspendovan u 1 ml hladnom, sterilnom 0,1 M CaCl₂ i inkubiran na ledu 5 min. Nakon toga, 50 μ l suspenzije pomešano je sa 2 μ l prethodno pripremljene ligacione smeše i inkubirano 30 min na ledu. Ćelijska suspenzija je izložena toplotnom šoku izlaganjem temperaturi od 42 °C u trajanju od 30 sekundi, a zatim 5-minutnoj inkubaciji na ledu. U

suspenciju sa transformisanim ćelijama dodato je 950 µl LB medijuma i suspenzija je vorteksovana i centrifugirana (13 000 rpm, 1 min). Pelet je resuspendovan u 100 µl LB medijuma i celokupna zapremina suspenzije inokulisana na LA podlogu, sa sledećim dodacima za plavo-belu selekciju: ampicilin (100 mg/ml), 5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid (X-gal, 50 mg/ml) i izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG, 0,1M). Podloge su inkubirane 24 h na 37 °C, a zatim prebačene na 4 °C, kao bi se obezbedilo preciznije razlikovanje boja kolonija.

Vektori sa ligiranom DNK jedinstvenih amplikona izolovani su iz prekonocnih kultura belih kolonija transformisanih *E. coli* DH5α kitom QIAprep Spin Miniprep (Qiagene, Netherlands). Kako bi se procenila uspešnost ligacije, transformacije i izolacije vektora, pozicija traka izolovane DNK je analizirana na agaroznom gelu. Trake veličine 3 kb, koje odgovaraju superuvijenoj (eng. *suopercoiled*) DNK je isečena i prečišćena iz gela. Sekvence tri klonirana jedinstvena DNK fragmenta umnožene su primenom pUC/M13 (Promega, SAD) prajmera za sekvenciranje, koji se vezuju za poznate sekvence vektora 220 bp uzvodno i nizvodno od inserta. PCR reakcionu smešu zapremine 50 µl činile su sledeće komponente: 5 µl 10 x KAPA Taq pufera, 3 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP mix (2,5 mM svakog nukleotida), 3,8 µl prajmera (10 µM), 2 µl vektorske DNK, 0,3 µl KAPA Taq polimeraze i 31,1 µl PCR vode. Uslovi za umnožavanje u PCR aparatu bili su sledeći: inicijalna denaturacija 5 min na 95 °C; 35 ciklusa denaturacije (1 min, 94 °C), hibridizacije (20 s, 40 °C) i elongacije (2 min, 72 °C); finalna elongacija 5 min na 75 °C. Rezultati umnožavanja provereni su na agaroznom gelu i jedinstveni fragmenti DNK su izolovani i prečišćeni iz PCR smeše GeneJET PCR Purification (ThermoFisher Scientific, SAD) kitom. DNK jedinstvenog fragmenta (5 µl) je pomešana sa 5 µl direktnog pUC/M13 prajmera (5 µM) i poslata na uslužno sekvenciranje Sangerovom metodom (Mix2Seq/Light Run, Eurofins Genomics GmbH, Nemačka). Provera kvaliteta sekvenci urađena je u FinchTV programu (Geospiza, Inc., SAD).

3.5.2 Dizajn i testiranje specifičnosti SCAR prajmera

Na osnovu sekvenci jedinstvenih RAPD fragmenata, dizajnirano je sedam pari SCAR prajmera za specifičnu detekciju tri izolata: *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i *B. pumilus* SS-8.1.2 (po dva para prajmera) i *B. amyloliquefaciens* SS-38.4 (tri para prajmera) (Tabela 2). SCAR prajmeri su dizajnirani u programu Primer3 v. 4.1.0 (Untergasser et al., 2012).

Kako su SCAR prajmeri bili primenjeni i za apsolutnu kvantifikaciju odabranog izolata putem kapljične digitalne reakcije polimeraze (eng. *droplet digital* – ddPCR), koja predstavlja visoko senzitivnu metodu, ispitana je mogućnost vezivanja prajmera za DNK *E. coli* sojeva često korišćenih u biotehnologiji. U testiranju su korišćeni genomi sledećih sojeva: ATCC 25922 (NZ_CP009072.1), BL 21 (NZ_CP053601.1), BW 25113 (NZ_CP009273.1), K12 MG1655 (NC_000913.3), K12 NEB (NZ_CP017100.1), RR1 (NZ_CP011113.2) i BL 21/DE3 (NC_012892.2). Genomi su preuzeti iz baze Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) i predstavljeni nazivom soja i referentnim brojem sekvence genoma u bazi (eng. *Reference Sequence* - RefSeq). *In silico* PCR urađen je u SnapGene v 6.1 (GSL Biotech LLC, SAD) programu.

Specifičnost različitih kombinacija SCAR prajmera za svaki od tri soja testirana je na celokupnoj *Bacillus* spp. kolekciji. PCR protokoli i programi su optimizovani za svaku kombinaciju prajmera i predstavljeni su u Tabeli 2.

Tabela 2. Sojevi korišćeni u ovom radu, dizajnirani SCAR prajmeri, zajedno sa reakcionim smešama i PCR programima. MM predstavlja OneTaq Quick-Load 2 × Master Mix sa standardnim puferom (NEB, SAD).

| Identifikacija | Soj | RAPD prajmer | Sekvenca SCAR prajmera (5'-3') | Kombinacije SCAR prajmera | Veličina jedinjevkih amplikona | SCAR-PCR protokol | | | | |
|---|----------|--------------|---|---|--------------------------------------|---|---|---|---|---|
| | | | | | | PCR smeša | SCAR-PCR programi | | | |
| <i>Bacillus pumilus</i> | SS-8.1.2 | OPO02 | SCAR8.1.2 - F1: AATGGCAATCGTCCCGATGT SCAR8.1.2 - R1: ACCATCCCACCTTCACCTCACC SCAR8.1.2 - F2: TGGCTCGGGTATTACAAGA SCAR8.1.2 - R2: TCCCATCTCCGTACCATCCC | SCAR8.1.2 - F1 & SCAR8.1.2 - R1 (MIX1) SCAR8.1.2 - F1 & SCAR8.1.2 - R2 (MIX 2) SCAR8.1.2 - F2 & SCAR8.1.2 - R1 (MIX 3) SCAR8.1.2 - F2 & SCAR8.1.2 - R2 (MIX 4) | 475 bp 487 bp 309 bp 321 bp | MM - 10 µl dH2O - 6 µl Prajmer MIX 1/2/3/4 - 1,5 µl | Inicijalna denaturacija Denaturacija Hibridizacija Elongacija Finalna elongacija | Temperatura 94 °C 94 °C 60 °C 72 °C 72 °C | Vreme 5 min 30 s 45 s 30 s 7 min | Ciklusi 30 x |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | SS-12.6 | RAPD 272 | SCAR12.6 - F1: GCACCAGAGCTAGAGCGCAACCT SCAR12.6 - R1: TACGTAGCGTCCTAAGATGGCT SCAR12.6 - F2: CGTAGCGTCACTGGAAAAG SCAR12.6 - R2: GATGTGTATCGCTGTCTGCCA | SCAR12.6 - F1 & SCAR12.6 - R1 (MIX 5) SCAR12.6 - F1 & SCAR12.6 - R2 (MIX6) SCAR12.6 - F2 & SCAR12.6 - R1 (MIX 7) SCAR12.6 - F2 & SCAR12.6 - R2 (MIX 8) | 414 bp 395 bp 465 bp 346 bp | MM - 10 µl dH2O - 7.2 µl Prajmer MIX 5/6/7/8 - 0,75 µl | Inicijalna denaturacija Denaturacija Hibridizacija Elongacija Finalna elongacija | Temperatura 94 °C 94 °C 62 °C 72 °C 72 °C | Vreme 1 min 30 s 1 min 30 s 10 min | Ciklusi 35 x |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (16 S rRNA) <i>Bacillus velezensis</i> (WGS) | SS-38.4 | OPB07 | SCAR38.4 - F1: CCGGATTGACGATATGTGGA SCAR38.4 - R1: GTTGTACGTGATTTAATGCGAATG SCAR38.4 - F2: CAATGAAAGCCTGCCTCTCT SCAR38.4 - R2: AAAAGCACCCACGAGTTTTTCG SCAR38.4 - F3: ACTCGTGGGTGCTTTTTGGA SCAR38.4 - R3: ACGTGATTTAATGCGAATGAAGA | SCAR38.4 - F1 & SCAR38.4 - R1 (MIX 9) SCAR38.4 - F2 & SCAR38.4 - R2 (MIX 10) SCAR38.4 - F3 & SCAR38.4 - R3 (MIX 11) SCAR38.4 - F2 & SCAR38.4 - R3 (MIX 12) | 646 bp 258 bp 188 bp 430 bp | MM - 10 µl dH2O - 7 µl Prajmer MIX 9/10/11 - 1 µl | MIX 9 prajmera Inicijalna denaturacija Denaturacija Hibridizacija Elongacija Finalna elongacija MIX 10/11/12 prajmera Inicijalna denaturacija Denaturacija Hibridizacija Elongacija Finalna elongacija | Temperatura 94 °C 94 °C 60 °C 72 °C 72 °C 94 °C 94 °C 55 °C 72 °C 72 °C | Vreme 4 min 1 min 1 min 30 s 10 min 4 min 30 s 1 min 15 s 7 min | Ciklusi 35 x 30 x |

3.6 Procena diverziteta *Bacillus* spp. kolekcije analizom gena za acil-homoserin laktone

Iz *Bacillus* spp. izolata koji su pokazali QQ aktivnost u *well-diffusion* testu izolovana je genomska DNK CTAB-hloroform metodom (Le Marrec et al., 2000). Genomska DNK dodata je u PCR smešu, ukupne zapremine 50 µl, koja je sadržala sledeće komponente: 25 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific, SAD), 21 µl PCR vode, 1 µl direktnog *aiiA*-F (5' - ATGACAGTAAARAARCTTTATTTTC - 3') prajmera koncentracije 10 µM i 1 µl reverznog *aiiA*-R (5' - TCACTATATATAYTCMGGGAACTC - 3') prajmera koncentracije 10 µM. Uslovi za umnožavanje DNK bili su sledeći: inicijalna denaturacija 5 min na 94 °C; 30 ciklusa denaturacije (1 min, 94 °C), hibridizacije (2 min, 55 °C) i elongacije (2 min, 72 °C); finalna elongacija 7 min na 72 °C. Prisustvo *aiiA* gena potvrđeno je detekcijom trake veličine 793 bp na 1% agaroznom gelu.

Umnoženi *aiiA* gen je izolovan i prečišćen iz PCR smeše korišćenjem kita GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD). Po 5 µl *aiiA* gena i 5 µl direktnog *aiiF* prajmera (5 µM) su pomešani i poslani na uslužno sekvenciranje Sangerovom metodom (Mix2Seq/Light Run, Eurofins Genomics GmbH, Nemačka). Kvalitet sekvenci je proveren u programu FinchTV.

Nukleotidne sekvence *aiiA* gena su translirane u aminokiselinske primenom EMBOSS TransSeq web servera, sa podešenim sledećim parametrima: okvir čitanja +1 (eng. *Reading frame one*) i bakterijska tabela kodona (eng. *Bacteria codon table*).

Za ispitivanje filogenetskog odnosa i diverziteta izolata na osnovu aminokiselinskih sekvenci *aiiA* gena, konstruisano je stablo Neighbour-joining metodom. Klasterovanje je rađeno u MEGA 11 programu (Tamura et al., 2021) primenom JTT (Jones-Taylor-Thompson) modela sa γ -distribucijom i „bootstrap” konsenzusom od 1000 ponavljanja. U interpretaciji rezultata korišćeno je kondenzovano stablo, na osnovu *cut-off* vrednosti 70% bootstrap pouzdanosti. Sekvence *aiiA* gena su poređene sa 25 odabranih *aiiA* sekvenci različitih *Bacillus* sp. dostupnih u NCBI bazi (Tabela 3).

Tabela 3. *aiiA* sekvence *Bacillus* spp. korišćene u analizi.

| <i>Bacillus</i> species | Accession Number | <i>Bacillus</i> species | Accession Number |
|-----------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | WNN27081.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-23.2 | PP841971 |
| <i>B. albus</i> | WP_336589945.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-23.3.1 | PP841972 |
| <i>B. anthracis</i> | WP_326042145.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-31.1 | PP841973 |
| <i>B. arachidis</i> | WP_286015682.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-31.2 | PP841974 |
| <i>B. atropheaus</i> | WP_328193263.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-31.3 | PP841975 |
| <i>B. cereus</i> | WP_336458662.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-35.1/2 | PP841976 |
| <i>B. clarus</i> | WP_042978938.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-35.2 | PP841977 |
| <i>B. dicomae</i> | WP_140971148.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-35.3 | PP841978 |
| <i>B. gaemokensis</i> | WP_033677072.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-35.5 | PP841979 |
| <i>B. fungorum</i> | WP_099685082.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-35.7 | PP841980 |
| <i>B. luti</i> | WP_151626741.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-35.8 | PP841981 |
| <i>B. megaterium</i> | ACX55098.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-36.1 | PP841982 |
| <i>B. mobilis</i> | WP_327798574.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-36.2 | PP841983 |
| <i>B. mycoides</i> | WP_070146799.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-36.4 | PP841984 |
| <i>B. nitratireducens</i> | WP_097809865.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-36.6/1 | PP841985 |
| <i>B. pacificus</i> | WP_229136099.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-36.6/2 | PP841986 |
| <i>B. paramobilis</i> | WP_336181747.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.1 | PP841987 |
| <i>B. paramycoides</i> | WP_328064864.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.1/2 | PP841988 |
| <i>B. paranthracis</i> | WP_284997747.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-35.6 | PP841989 |
| <i>B. proteolyticus</i> | WP_071747546.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.2/1 | PP841990 |
| <i>B. subtilis</i> | CUB50997.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.2/2 | PP841991 |
| <i>B. thuringiensis</i> | WP_335466617.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.3 | PP841992 |
| <i>B. tropicus</i> | WP_337679459.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.4 | PP841993 |

| | | | |
|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------|
| <i>B. toyonensis</i> | WP_335447769.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.6 | PP841994 |
| <i>B. wiedmannii</i> | WP_327973071.1 | <i>Bacillus</i> sp. SS-37.7 | PP841995 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-1.1 | PP841946 | <i>Bacillus</i> sp. SS-39.1 | PP841996 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-2.1.2 | PP841947 | <i>Bacillus</i> sp. SS-39.2 | PP841997 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-2.1.3 | PP841948 | <i>Bacillus</i> sp. SS-39.3 | PP841998 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-2.3/1 | PP841949 | <i>Bacillus</i> sp. SS-40.3 | PP841999 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-2.8 | PP841950 | <i>Bacillus</i> sp. SS-40.6/2 | PP842000 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-2.11 | PP841951 | <i>Bacillus</i> sp. SS-27.7 | PP842001 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-2.12.1 | PP841952 | <i>Bacillus</i> sp. SS-29.2 | PP842002 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-6.5 | PP841953 | <i>Bacillus</i> sp. SS-32.4 | PP842003 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-10.3 | PP841954 | <i>Bacillus</i> sp. SS-32.5 | PP842004 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-10.8.1 | PP841955 | <i>Bacillus</i> sp. SS-32.8 | PP842005 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-11.2.2 | PP841956 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.1 | PP842006 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-12.3 | PP841957 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.2 | PP842007 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-12.9.2 | PP841958 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.3 | PP842008 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-14.6 | PP841959 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.4 | PP842009 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-15.2 | PP841960 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.5 | PP842010 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-16.2 | PP841961 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.6 | PP842011 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-17.3 | PP841962 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.7 | PP842012 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-17.4 | PP841963 | <i>Bacillus</i> sp. SS-33.8 | PP842013 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-18.2 | PP841964 | <i>Bacillus</i> sp. SS-34.1 | PP842014 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-19.1 | PP841965 | <i>Bacillus</i> sp. SS-34.3 | PP842015 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-20.1 | PP841966 | <i>Bacillus</i> sp. SS-34.4 | PP842016 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-21.5/1 | PP841967 | <i>Bacillus</i> sp. SS-34.5 | PP842017 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-21.6 | PP841968 | <i>Bacillus</i> sp. SS-34.7 | PP842018 |
| <i>Bacillus</i> sp. SS-22.2 | PP841969 | <i>Bacillus</i> sp. SS-27.6 | PP842019 |

Potencijalni uticaj razlika u aminokiselinskim sekvencama na aktivnost i diverzitet AiiA AHL-laktonaza *Bacillus* spp. izolata ispitan je primenom bioinformatičkih web-servera. Procenat istih, sličnih i varijabilnih aminokiselina izračunat je nakon višestrukog poravnanja sekvenci (eng. *Multiple Sequence Alignment using the Fast Fourier Transform - MAFFT*) na EMBL-EBI web-serveru (Madeira et al., 2019). Sekvence su zatim analizirane na prisustvo razlika u aminokiselinama specifičnim za aktivno mesto AiiA laktonaza i Zn²⁺-vezujuće motive primenom NCBI Conserved Domain Search servera (Wang et al., 2023). SwissModel server (Waterhouse et al., 2018) korišćen je za izradu modela YtnP i AiiA laktonaza, na kojima je rađena simulacija vezivanja liganda C₆-HSL (eng. *molecular docking analysis*). Analiza je rađena korišćenjem CB-Dock2 servera (Liu et al., 2022), sa selektovanim sledećim parametrima: pet šupljina ("cavities") za dokovanje i opcija *Auto Blind Docking*. Rezultati su analizirani na osnovu metodologije dokovanja zasnovane na strukturi (eng. *Structure-Based Blind Docking*), bez prethodnog znanja o mestu vezivanja liganda.

3.7 In vitro testovi na *Bacillus* spp. kolekciji

3.7.1 Utvrđivanje antagonističkog dejstva *Bacillus* spp. izolata

Antagonistička aktivnost 251 *Bacillus* spp. izolata testirana je na odabranim sojevima *P. syringae* pv. *aptata* P21 (jako virulentan) i P17 (slabo virulentan) difuzionom metodom u bunarićima (eng. *well-diffusion assay*). Prekonoćne kulture *Bacillus* spp. izolata odgajene su u LB medijumu na 30 °C i centrifugirane na 3000 rpm, 10 min. U 7 ml LA soft agar podloge inokulisano je 300 µl prekonoćnih kultura sojeva P21 i P17 i razliveno na LA podlogu sa postavljenim modlama za bunariće (prečnika 5 mm, visine 7 mm). U bunariće je nalivano po 50 µl supernatanta *Bacillus* spp. izolata. Petri šolje su inkubirane na sobnoj temperaturi preko noći. Antagonistička aktivnost određena je merenjem prečnika zone inhibicije sojeva P21 i P17 izraženim u milimetrima.

Izolati sa najvećim prečnicima zona inhibicije odabrani su za dalje ispitivanje antagonističke aktivnosti lipopeptida prema sojevima P21 i P17. Protokol testiranja bio je isti kao prethodno opisani za ispitivanje antagonističkog efekta supernatanta, s tim što su u bunariće dodati lipopeptidni ekstrakti.

3.7.2 Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida *Bacillus* spp. sojeva

Po 2 ml prekonoćnih kultura šest *Bacillus* spp. sojeva (*B. pumilus* SS-10.6, *B. pumilus* SS-36.3, *B. velezensis* SS-6.6.1, *B. halotolerans* SS-30.5, *B. pumilus* SS-8.1.2, *B. thuringiensis* SS-20.1) zasejano je u 1 l LB medijuma i inkubirano 48 h na 30 °C, uz šejkiranje na 180 rpm. Kulture su centrifugirane na 5000 rpm, 20 min, na 4 °C. Supernatanti su profiltrirani kroz 0.45 µm celulozne filtere (AXIVA, Syringae Filters Streile, Indija). Pojedinačni supernatanti su pomešani sa etil-acetatom u odnosu 1:1, a zatim je dodato 30 g/l NaCl i smeše su postavljene na magnetnu mešalicu na 500 rpm, preko noći. Sutradan, nakon jasnog razdvajanja dve faze iz prvobitne smeše, gornja, etil-acetatna faza je pažljivo prikupljena.

Etil-acetatna faza je uparena do suva rotirajućim evaporatorom (Buchi R-215 Rotavap sa B-480 vodenim kupatilom, Švajcarska) na 40 °C. Talog je ispran sa 2 ml etil-acetata, koji je ostavljen da isparava 48 h u kapeli. Rastvaranjem taloga u 0,5% dimetil sulfoksidu (DMSO) dobijeni su etil-acetatni ekstrakti lipopeptida koncentracije 100 mg/ml. Koncentrovani stokovi ekstrakta čuvani su na 4 °C do upotrebe.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBK) etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida određene su za šest odabranih *Bacillus* spp. sojeva na odabranim fitopatogenima sojevima *P. syringae* pv. *aptata* P21 i P17. Test je rađen mikrodilucionom metodom u mikrotitarskim pločama, u zapremini od 200 µl. Početne koncentracije ekstrakata iznosile su 5 mg/ml, a zatim su pripremljena sukcesivna dvostruka razblaženja u LB medijumu do finalne koncentracije od 0,039 mg/ml. Prekonoćne kulture sojeva P17 i P21 su razblažene do optičke gustine OD₆₀₀ 0,5, koja odgovara koncentraciji ćelija od 10⁸ CFU/ml, što je eksperimentalno pokazano na osnovu konstrukcije krive rasta sojeva na temperaturi od 30 °C i šejkiranju pri 180 rpm. Kulture su dodate u sve bunare osim u negativnu kontrolu (kontrolu sterilnosti), u koju se nalazio samo LB medijum. Pored negativne kontrole, korišćene su i sledeće kontrole: kontrola rasta (sojevi bez dodatih ekstrakata) kontrola rastvarača (DMSO u koncentraciji 0,6%) i pozitivna kontrola (streptomycin početne koncentracije 1 mg/ml). Indikator rasta bio je resazurin (finalna koncentracija 0,675 mg/ml, Resazurin Sodium Salt TCI, Belgija). Mikrotitarske ploče su inkubirane na 30 °C, 24 h. Promena boje resazurina iz ljubičaste u ružičastu ukazivala je na bakterijsku aktivnost, dok je najniža koncentracija ekstrakta pri kojoj nije došlo do promene boje određena kao MIK. Koncentracija pri kojoj nije detektovan rast nakon zasejavanja na podlogu određena je kao MBK vrednost.

Interakcija između dva ekstrakta (SS-8.1.2 i SS-36.3) sa najnižim MIK vrednostima ispitana je njihovim mešanjem u odnosu 1:1, radi određivanja tipa efekta – sinergističkog, aditivnog, neutralnog ili antagonističkog. Frakciona inhibitorna koncentracija (eng. *Fractional Inhibitory Concentration* – FIC) predstavlja odnos MIK više ekstrakata u kombinaciji i MIK istih ekstrakata kada se primenjuju samostalno. Frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks (FIC_i) izračunat je kao zbir FIC vrednosti za svaki ekstrakt nakon postavke i inkubacije mikrotitarske ploče prema prethodno navedenim uslovima. Na osnovu vrednosti FIC_i određen je tip interakcije (EUCAST, 2000): sinergistički (FIC_i ≤ 0,5), aditivni (0,5 ≥ FIC_i ≤ 1), neutralan (1 ≥ FIC_i ≤ 2) i antagonistički (FIC_i ≥ 2).

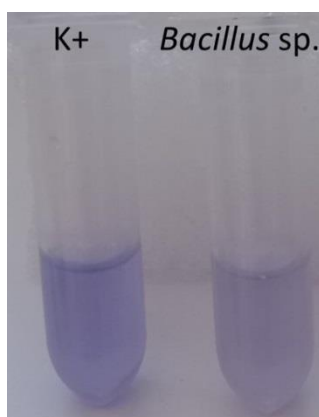
3.7.3 Ispitivanje *quorum quenching* aktivnosti *Bacillus* spp. izolata

Bacillus spp. izolati (251) odgajeni su u LB medijumu sa dodatkom 10 μ M N-heksanoil-DL-homoserin laktona (C₆-HSL \geq 97% (HPLC) Sigma-Aldrich, SAD). Mutantni soj *C. violaceum* CV026 korišćen je kao biosensor za detekciju degradacije acil-homoserin laktona. Soj je odgajen u LB medijumu sa dodatkom kanamicina (20 μ g/ml). Sve bakterije su inkubirane 24 h, na 30 °C, uz šejkiranje.

Sposobnosti *Bacillus* spp. izolata da degraduju AHL ispitana je *well-diffusion* metodom (Reina et al., 2019). Ukratko, 70 μ l prekonoćne kulture *C. violaceum* CV026 pomešano je sa 7 ml LA-soft agar medijuma i razliveno preko LA podloge na koju su prethodno postavljene modle za bunariće. Prekonoćne kulture *Bacillus* spp. su centrifugirane (10000 rpm, 10 min) i 50 μ l supernatanta je dodato u formirane bunariće. U jedan bunarić dodat je 10 μ M rastvor C₆-HSL u LB medijumu koji je služio kao negativna kontrola. Petri šolje su inkubirane 24 h na 30 °C. Odsustvo ljubičastog pigmenta oko bunarića označavalo je pozitivan rezultat, odnosno QQ aktivnost *Bacillus* spp. izolata kroz degradaciju C₆-HSL.

QQ aktivnost *Bacillus* spp. izolata kvantifikovana je testom inhibicije produkcije violaceina (Packiavathy et al., 2021). U prekonoćnu kulturu *C. violaceum* CV026 razblaženu na OD 0,1, dodati su 10 μ M C₆-HSL i pojedinačni supernatanti *Bacillus* spp. izolata sa QQ aktivnošću. Koncentracije supernatanta u smeši iznosile su 5, 10 i 20%, a test je rađen u triplikatu. Negativnu kontrolu predstavljala je *C. violaceum* CV026 kultura (OD 0,1) sa 10 μ M C₆-HSL bez dodatka supernatanta. Ovako pripremljene *C. violaceum* CV026 kulture su inkubirane 24 h, na 30 °C, uz šejkiranje. Nakon inkubacije kulture su centrifugirane (8000 rpm, 10 min), talog je resuspendovan u jednakoj zapremini DMSO i suspenzije su ponovo centrifugirane pod istim uslovima. Inhibicija produkcije violaceina praćena je kroz promenu intenziteta boje supernatanta (Slika 6) spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 285 nm (A₂₈₅). Vrednost inhibicije kvantifikovana je putem formule (Bali et al., 2019):

$$\text{Inhibicija produkcije violaceina (\%)} = \frac{A_{585}(K-) - A_{585}(\text{Dodatak supernatanta } Bacillus \text{ spp.})}{A_{585}(K-)} \times 100$$



Slika 6. Primer *quorum quenching* aktivnosti kroz inhibiciju sinteze violaceina. U mikrotubi sa dodatim supernatantom *Bacillus* sp. uočava se svetlija boja violaceina u odnosu na pozitivnu kontrolu (kultura *C. violaceum* sa C₆-HSL bez dodatka supernatanta) (foto I. Rosić).

Statistički značajne vrednosti QQ aktivnosti izražene kroz inhibiciju produkcije violaceina određene su jednofaktorskom analizom varijansi (eng. *One-way Analysis of Variance* – ANOVA), sa Fišerovim *post-hoc* testom za najmanju značajnu razliku (eng. *Least Significant Difference*-LSD) bez korekcije za višestruka poređenja, i nivoom značajnosti $P \leq 0,05$. Analiza je urađena u programu GraphPad Prism v.8.4.3

3.7.4 Ispitivanje solubilizacije minerala

Sojevi SS-38.4 i P21 su odgajeni u prekončnoj kulturi u LB medijumu, na 30 °C, uz šejkiranje na 180 rpm. Kulture su centrifugirane (5000 rpm, 10 min), talog je resuspendovan u 0,01 M MgSO₄ i 20 µl suspenzije je naneto na površinu različitih medijuma za praćenje solubilizacije. Rezultati su očitavani nakon inkubacije podloga na sobnoj temperatura, u trajanju od 10 dana.

Solubilizacija fosfata ispitana je na Pikovskaja agru sa Ca₃(PO₄)₂ kao jednim izvorom fosfora. Pojava prosvetljene zone oko kolonija na medijumu je ukazala na sposobnost solubilizacije fosfata. Sposobnost solubilizacije je kvantifikovana preko indeksa solubilizacije fosfora (eng. *Phosphorus Solubilization Index* - PSI), izračunatog na osnovu zbira prečnika kolonije i prosvetljene zone solubilizacije, podeljenog sa prečnikom kolonije (Eshaghi et al., 2019).

Aleksandrov agar korišćen je za ispitivanje solubilizacije kalijuma iz soli kalijum-aluminijum-silikata. Pozitivan rezultat predstavljala je pojava prosvetljene zone oko kolonija.

Solubilizacija cinka testirana je na osnovu pojave prosvetljenja oko kolonija na medijumu za solubilizaciju cinka (Hashemnejad et al., 2021) koji je sadržao ZnO ili ZnSO₄.

Solubilizacija mangana praćena je na osnovu pojave prosvetljenja oko kolonija na medijumu za praćenje solubilizacije mangana (Ijaz et al., 2021) iz tri različite soli: MnO₂, MnCl₂ i MnSO₄.

Solubilizacija gvožđa testirana je kroz praćenje sinteze siderofora na CAS medijumu (Schwyn & Neilands, 1987). Ukratko, rastvori A i B su pomešani nakon autoklaviranja, a zatim je po 10 ml smeše razliveno preko prethodno pripremljene LA podloge. Pojava narandžaste zone oko kolonija na plavoj podlozi označavala je pozitivan rezultat. Aktivnost je kvantifikovana kroz indeks produkcije sidrofora (eng. *Siderophore-Producing index* - SPI) (Eshaghi et al., 2019).

3.7.5 Ispitivanje produkcija amonijaka, indol-3-sirćetne kiseline i cijanovodonika

Za testiranje sposobnosti produkcije amonijaka sojevi SS-38.4 i P21 odgajeni su u 4% peptonskoj vodi, uz šejkiranje na 180 rpm, 96 h, na 30 °C. Jednaka zapremina Neslerovog reagensa dodata je u kulture nakon inkubacije. Pozitivan rezultat predstavljala je promena boje suspenzije iz žute u narandžasto-braon neposredno nakon dodatka Neslerovog reagensa. Rezultati su upoređeni sa negativnom kontrolom koju je predstavljala peptonska voda sa dodatkom Neslerovog reagensa.

Detekcija produkcije IAA ispitana je nakon gajenja sojeva SS-38.4 i P21 u 5 ml LB medijuma sa dodatkom glukoze i triptofana u koncentracijama 4 g/l. Kulture su inkubirane uz šejkiranje na 180 rpm, 96 h, na 30 °C u mraku (Romasi & Lee, 2013). Nakon inkubacije kulture su centrifugirane 1 min na 13000 rpm. Supernatant i Salkowski reagens su pomešani u odnosu 1:1 i smeša je inkubirana 30 min, u mraku. Pozitivan rezultat predstavljala je promena boje smeše iz žute u ružičastu, dok je u negativnoj kontroli LB medijuma i Salkowski reagensa boja ostala žuta.

Detekcija produkcije HCN izvršena je na osnovu protokola opisanog u Turnau et al. (2021). Sojevi SS-38.4 i P21 zasejani su u TSA medijum sa 4,4 g/l glicina. Filter papir prečnika 90 cm je sterilisan i potopljen u 2% rastvor Na₂CO₃, a zatim u 0,5% rastvor pikrinske kiseline. Nakon sušenja, filter papir je postavljen u poklopac Petri šolje u koju su zasejani sojevi. Petri šolje su obložene parafilmom i ostavljene na inkubaciju 96 h, na sobnoj temperaturi. Pozitivan rezultat predstavljala je promena boje filter papira iz žute u braon.

3.7.6 Ispitivanje produkcije biofilma i pokretljivost tipa plivanja i rojenja

Testiranje sposobnosti produkcije biofilma urađeno je nakon pripreme prekončne kulture SS-38.4 i P21 u TSB medijumu sa 0,2% glukoze. Kulture su podešene na OD 0,5 i sipane u Petri šolju, tako da suspenzija prekrije dno. Suspenzije su inkubirane 48 h na sobnoj temperaturi i statičnim uslovima. Nakon inkubacije, medijum je pažljivo uklonjen, a formirani biofilm obojen 0,1% rastvorom kristal violeta. Višak boje je ispran destilovanom vodom, a sposobnost formiranja biofilma procenjavana je vizuelno, na osnovu prisustva obojenog sloja na površini Petri šolje.

Priprema za test ispitivanja pokretljivosti tipa plivanja (eng. *swimming*) i rojenja (eng. *swarming*) obuhvatila je prvo podešavanje optičke gustine prekonoćne kulture SS-38.4 (u LB medijumu) i P21 (u KB medijumu) na OD 0,3. Po 1 ml svake kulture je, zatim, centrifugiran (8000 rpm, 10 min) i talog je resuspendovan u jednakoj zapremini 0,01 M MgSO₄.

Za ispitivanje pokretljivosti tipa plivanja, suspenzije SS-38.4 i P21 su inokulisane na sredinu „Swimming” medijuma u Petri šolji, sterilnim nastavkom pipete, pažljivo kako vrh nastavka ne bi dodirnuo dno Petri šolje (Schwenk et al., 2022).

Za ispitivanje pokretljivosti tipa rojenja, 3 µl suspenzije SS-38.4 i P21 inokulisano je na centar Petri šolje sa „Swarming” medijumom (Morales-Soto et al., 2015).

Nakon inkubacije u trajanju od 24 h na sobnoj temperaturi u mraku, izmerena je površina puta koji su sojevi prešli od mesta zasejavanja i izražena u procentima u odnosu na površine Petri šolje.

3.8 *In planta* testovi

3.8.1 *In planta* testiranje inhibitorne aktivnosti odabranih etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida

Aktivnost dva etil-acetatna ekstrakata lipopeptida najniže MIK vrednosti u inhibiciji sojeva *P. syringae* pv. *aptata* testirana je na šećernoj repi staroj tri nedelje (*Beta vulgaris*, Heston Hybrid variety, Maribo, Denmark). Biljke su odgajane u pojedinačnim saksijama, u 0,5 l Potground H supstrata (Klasman-Deilmann, GmbH, Nemačka).

Prekonoćne kulture P21 i P17 razblažene su do OD 0,2 (10⁸ CFU/ml) i pomešane sa odabranim koncentracijama ekstrakata svakog od dva *Bacillus* sp. soja u odnosu 1:1 i 1:4. Za ekstrakt SS-8.1.2 koncentracije su bile sledeće: 0,3125 mg/ml (MIK), 1 mg/ml i 5 mg/ml (MBK). Za ekstrakt SS-36.3 testirana je samo MIK koncentracija od 5 mg/ml. Razblaženja ekstrakata su pravljena u rastvaraču DMSO. Pripremljene smeše su inokulisane u mezofil listova između dva nerva prislanjanjem šprica bez igle zapremine 1 ml. U svaki list je inokulisano po 100 µl svake kombinacije ekstrakta sa kulturama patogena odgovarajuće koncentracije i u odgovarajućem odnosu, u tri ponavljanja. Pozitivna kontrola sadržala je samo suspenziju P17 ili P21, a negativna kontrola DMSO koncentracije 0,6%.

Inokulisane biljke su postavljene u improvizovane vlažne komore - zatvorene plastične kutije sa zidovima nakvašenim vodom (Slika 7A), i dnom pokrivenim vodom (do 1 cm). Biljke su postavljene tako da ne dodiruju zidove kutija i da se međusobno ne dodiruju i inkubirane su na 23 °C, pri vlažnosti od 90% i fotoperiodom od 12 h. Izostanak nekroze lista koja se širi od mesta inokulacije (Slika 7B i 7C) označavao je pozitivnu reakciju, odnosno inhibitorno dejstvo ekstrakata. Praćenje pojave i razvoja simptoma bolesti je vršeno svakodnevno tokom sedam dana.

Rezultati su analizirani dvofaktorskim ANOVA i Takijevim *post-hoc* testovima.



Slika 7. Postavka uslova kojima su biljke šećerne repe izložene tokom eksperimenta (A). Simptomi u pozitivnoj kontroli (listovi inokulisani samo suspenzijom *P. syringae* pv. *aptata* P21) - na slici (B) uočavaju se početni simptomi, 1-2 dana nakon inokulacije (eng. *water-soaked symptoms*), koji prelaze u nekrotično tkivo, koje se širi od mesta inokulacije (C) (foto I. Rosić).

3.8.2 Praćenje kolonizacije filofsere šećerne repe i biokontrolne aktivnosti SS-38.4 *in planta*

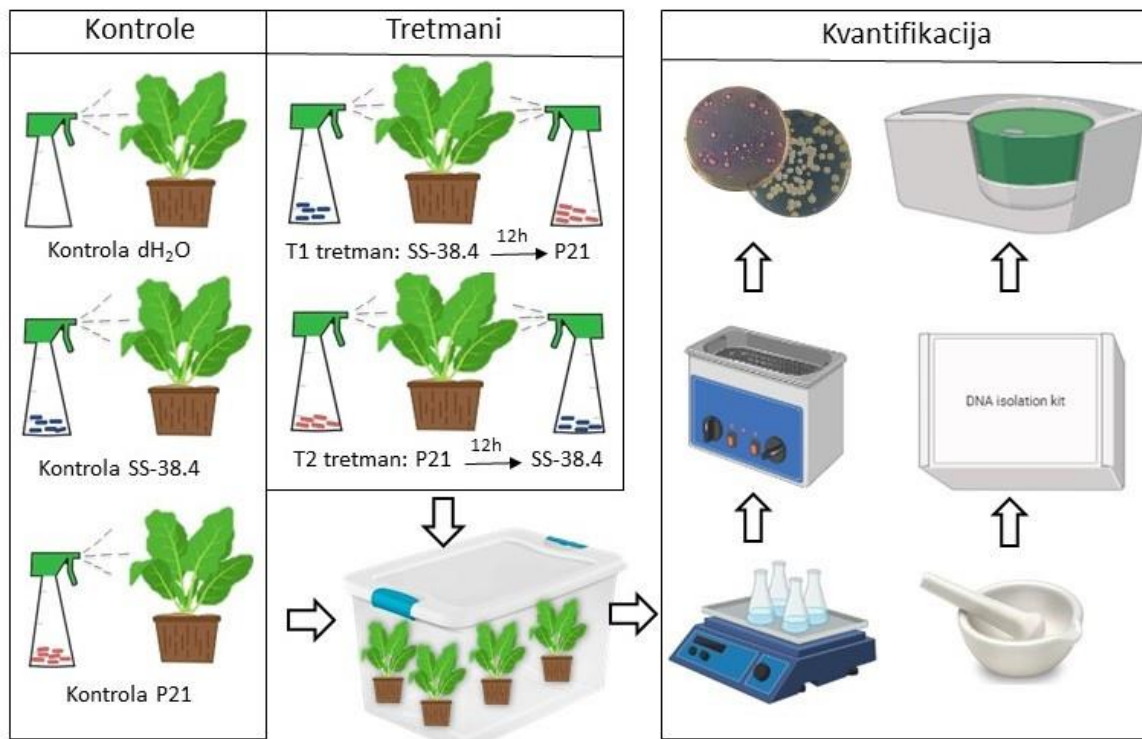
Biljke šećerne repe (Heston Hybrid variety, Maribo, Denmark) stare osam nedelja, svaka sa četiri prava lista, podeljene su u pet grupa - tri kontrolne i dve tretirane grupe, po četiri biljke (Slika 8). Površine listova su sterilisane nežnim brisanjem listova pamučnom vatom natopljenom 70% etanolom. Biljke su postavljene u improvizovane vlažne komore (70-90% vlažnosti vazduha), na temperaturu od 25 °C, 12 h pre početka eksperimenta.

Za tretiranje biljaka pripremljene su suspenzije sojeva SS-38.4 i P21 u 0,01 M MgSO₄. Oba soja su gajena u LB medijumu 6 h, na 30 °C (SS-38.4) i 28 °C (P21), uz šejkiranje na 180 rpm. Zasejavanjem decimalnih razblaženja je potvrđeno da pod navedenim uslovima oba soja dostižu 10⁸ CFU/ml, što odgovara optičkoj gustini OD 0,2. Nakon dostizanja odgovarajuće OD, sojevi su centrifugirani (5000 × g, 10 min) i pelet je resuspendovan u jednakoj zapremini 0,01 M MgSO₄.

Listovi kontrolnih grupa biljaka prskani su sterilnom destilovanom vodom, suspenzijom SS-38.4 ili suspenzijom P21. Dva tretmana, označena kao T1 i T2, osmišljena su tako da odgovore na razlike u redosledu primene biokontrolnog soja i biljnog patogena. U tretmanu T1 su listovi prvo tretirani suspenzijom biokontrolnog soja SS-38.4, a nakon 12 h suspenzijom fitopatogena P21. U tretmanu T2 redosled primene je bio obrnut. Suspenzije i sterilna destilovana voda su primenjene na svaki od četiri lista uniformnim raspršivanjem po 2 ml tečnosti. Biljke su inkubirane u vlažnoj komori, pod prethodno navedenim uslovima, pogodnim za ulazak biljnog patogena u apoplast i razvoj bolesti.

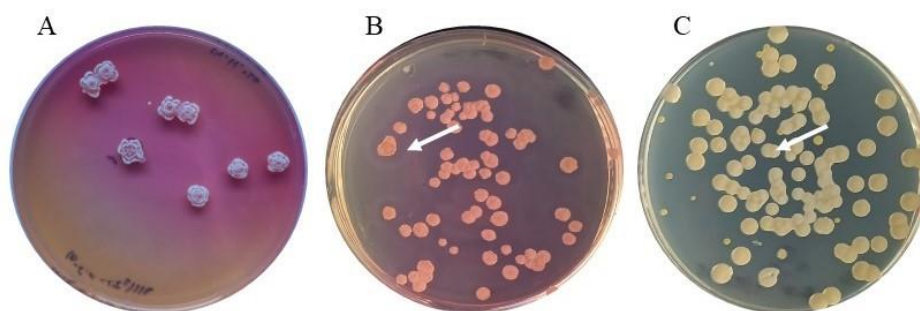
Sposobnost kolonizacije i biokontrolna aktivnost SS-38.4 soja u filofsere praćena je tokom perioda od 14 dana, pri čemu su analize rađene prvog, petog, sedmog i 14. dana nakon tretmana. Biokontrolna aktivnost kvantifikovana je merenjem procenta površine lista sa nekrotičnim lezijama u ImageJ programu.

Za praćenje sposobnosti kolonizacije i procene brojnosti populacije svakog soja u filiosferi, primenjena su dva pristupa: relativni metod, koji je podrazumevao kvantifikaciju na osnovu broja kolonija sojeva na odgovarajućoj podlozi i apsolutni metod kvantifikacije biokontrolnog soja primenom ddPCR. Za obe metode kvantifikacije odabrana su po tri lista sa tri različite biljke, iz svake grupe, za svaki dan merenja. Težina i površina listova su određeni odmah nakon isecanja sa biljke, a zatim su listovi isečeni na jednake polovine duž glavnog nerva. Jedna polovina je korišćena za relativnu, a druga za apsolutnu kvantifikaciju.



Slika 8. Postavka eksperimenta praćenja kolonizacije i biokontrolne aktivnosti SS-38.4 sa šemom mikrobiološke i molekularne metode kvantifikacije brojnosti populacije. Po četiri biljke za svaki tretman i kontrolu su postavljene u opisane uslove. Uzorkovanje listova za kvantifikaciju i praćenje redukcije simptoma lisne pegavosti rađeno je jedan, pet, sedam i 14 dana nakon inokulacije (slika I. Rosić).

Polovina lista je isečena na manje delove, koji su ubačeni u 50 ml sterilnog $1 \times$ PBS. Uzorci su šejkirani 10 min na 270 rpm, a zatim izloženi ultrazvuku frekvencije 35 kHz tokom 8 min na ultrazvučnom kupatilu (Sonorex Super RK100H heated ultrasonic bath, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Nemačka). Različita razblaženja uzoraka listova (10^{-1} - 10^{-5}), sa biljaka iz kontrolne grupe SS-38.4, T1 i T2 su zasejana na dva tipa podloga: neselektivni hranljivi agar (NA) i selektivni Chromogenic *Bacillus* agar bez i sa PolyB suplementom (Slika 9A i 9B). Uzorci listova kontrole P21, T1 i T2 zasejani su na podlogu hranljivi agar sa saharozom (NAS), koja omogućava razlikovanje levan-pozitivnih kolonija soja P21 (Slika 9C). Podloge su inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 48 h.



Slika 9. Morfologija kolonija: Slika (A) predstavlja kolonije SS-38.4 na Chromogenic *Bacillus* agaru bez dodatka polimiksina; na slici (B) je SS-38.4 na Chromogenic *Bacillus* agaru sa dodatkom polimiksina B gde su uočava karakterističan oreol oko kolonija; slika (C) predstavlja levan-produkujuće kolonije P21 soja (foto I. Rosić)

Relativna brojnost SS-38.4 i P21 je izračunata preko sledeće formule i izražena kroz broj kolonija po cm^2 polovine lista (CFU/cm^2) u logaritamskoj skali:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{Br. kol.} \times V_{(1 \times \text{PBS})}}{r \times V_{\text{inok}} \times P_{\text{list}/2}}$$

Br. kol. – broj kolonija na NA ili NAS medijumu

$V_{(1 \times \text{PBS})}$ – zapremina PBS u koju su dodati delovi polovine listova (50 ml)

r – razblaženje zasejano na podlogu

V_{inok} – zapremina razblaženja koje je zasejano na podlogu (100 μl)

$P_{\text{list}/2}$ – površina polovine lista

Druge polovine listova sa biljaka tretiranih samo suspenzijom SS-38.4 i tretmanima T1 i T2 su homogenizovane u avanu sa tučkom. Po 80 mg listova je korišćeno za izolaciju DNK pomoću DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemačka). DNK izolovana iz biljaka prskanih samo sterilnom vodom služila je kao negativna kontrola. Koncentracije izolovanih DNK izmerene su spektrofotometrijski (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, SAD) i standardizovane na 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pre početka analize uzoraka, ddPCR protokol i program je optimizovan na genomskoj DNK soja SS-38.4 koja je predstavljala pozitivnu kontrolu. U optimizaciji su korišćene dve negativne kontrole: izolovana biljna DNK (za potvrdu specifičnosti SCAR prajmera za soj specifičan genom) i kontrola bez matrice (eng. *No Template Control* - NTC) za proveru prisustva kontaminanata u reakciji. U bunariće ddPCR ploče od 96 bunarića, dodata je reakciona smeša zapremine 20 μl , koja se sastojala od sledećih komponenti: 10 μl 2 \times ddPCR Supermix EvaGreen (Biorad, SAD), 6,2 μl PCR vode (Invitrogen, SAD), 0,9 μl direktnog i reverznog SCAR prajmera koncentracije 10 μM i 2 μl uzorka DNK. Nalivena ploča je zatvorena samolepljivom folijom (PX1 PCR plate sealer, Biorad, SAD) i prebačena u ddPCR generator kapljica (QX200 droplet generator, Biorad, SAD). Generisane kapljice su, zatim, prebačene u PCR ploču i reakcija amplifikacije je započeta u aparatu PCR C1000 Touch thermocycler (Biorad, SAD). Nakon amplifikacije, ploča je prenetu u čitač QX200 droplet reader (Biorad, SAD), gde je sadržaj kapljica analiziran i kvantifikovan primenom Quanta Soft v1.7 programa.

U ovoj fazi ispitana je uspešnost različitih ddPCR programa. U skladu sa predloženim protokolom proizvođača ddPCR aparata, program je obuhvatao sledeće korake: aktivacija enzima na 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 40 ciklusa denaturacije (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 sekundi) i hibridizacije (56-65 $^{\circ}\text{C}$ opsega testiranih temperatura, 1 min), nakon čega je usledio interval stabilizacije signala (4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 90 $^{\circ}\text{C}$, 5 min). Optimizacija je, pored variranja temperatura i vremena hibridizacije, obuhvatala i

ispitivanje variranja koncentracije DNK uzorka na uspešnost ddPCR reakcije. Detalji testiranih sastava reakcionih smeša i ddPCR programa dati su u Prilozima 13-19.

Finalni protokol primenjen za kvantifikaciju SS-38.4 u filosferi, u odnosu na predloženi protokol, razlikovao se u produženom trajanju hibridizacije na 65 °C koja je iznosila 6 min. Sve reakcije su rađene u duplikatu, a kapljice su klasifikovane kao pozitivne (sa umnoženom DNK) i negativne (bez umnožene DNK) na osnovu praga amplitude fluorescencije postavljenog na 15000.

Apsolutna brojnost populacije soja SS-38.4 (uključujući i žive i mrtve ćelije) određena ddPCR metodom, izračunata je primenom sledeće formule i izražena kroz logaritamsku skalu:

$$Br. SS - 38.4 = \frac{\frac{kopija}{\mu l}(100 \mu l uzorka) \times m_{polovina-lista(mg)}}{80 (mg)}$$

Statističke analize urađene su u programima GraphPad Prism v 8.4.3 i R v. 4.3.0. Eksperimentalni podaci o relativnoj i apsolutnoj brojnosti bakterija i biokontrolnoj aktivnosti prvo su ispitani Šapiro-Vilkovim testom normalnosti. Dvofaktorska analiza varijansi (eng. *Two-way ANOVA*) i Takijev *post-hoc* test, sa nivom značajnosti $P \leq 0,05$, primenjeni su kako bi se ispitale potencijalne razlike u biokontrolnoj aktivnosti SS-38.4 soja u tretmanima T1 i T2, kao i za poređenje brojnosti biokontrolnog SS-38.4 soja i biljnog patogena P21 u kontrolama i tretmanima. Pirsonov test korelacije primenjen za određivanje odnosa između rezultata brojnosti populacije SS-38.4 dobijenih relativnom i apsolutnom metodom. Multivarijaciona statistička analiza redundancije (RDA) korišćena je za ispitivanje odnosa brojnosti biokontrolnog soja i biljnog patogena (izraženim u CFU/cm²) sa smanjenjem ili povećanjem simptoma nekroze listova (izraženim u procentima).

3.9 Analiza genoma biokontrolnog soja SS-38.4

3.9.1 Sekvenciranje, asembliranje i anotacija genoma soja SS-38.4

Izolacija i prečišćavanje genomske DNK SS-38.4 urađena je primenom kita Nanobind CBB Big DNA (Pacific Bioscience, SAD), prateći protokol za gram-pozitivne bakterije. Za pripremu biblioteke DNK fragmenata korišćen je SMRTbell prep kit 3.0 (Pacific Bioscience, SAD). Formirane matrice (SMRTbell templates) su fiksirane za SMRT ćeliju, koja je ubačena u PacBio Sequel II system za sekvenciranje pojedinačnih molekula u realnom vremenu (eng. *Single Molecule Real-Time - SMRT*).

De novo asembliranje genoma od dobijenih sirovih sekvenci urađeno je u Canu v2.0 programu (Koren et al., 2017). Tačnost asembliranja pojačana je korekcijom potencijalnih grešaka u programu Racon v1.5.0 (Vaser et al., 2017). Kvalitet novoasembliranog genoma ocenjen je analizom u programu QUAST v5.2.0 (Gurevich et al., 2013).

Anotacija genoma urađena je primenom dva sistema za anotaciju: NCBI Automated Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) i Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) web servera (<https://rast.nmpdr.org/>). Cirkularni genom vizuelizovan je u web serveru Proksee CG Viewer (Grant et al., 2023).

3.9.2 Filogenija, taksonomija i komparativna genomika

Za ispitivanje taksonomskog i filogenetskog položaja SS-38.4, u analizi je korišćeno ukupno 50 odabranih genoma koje su činili referentni genomi predstavnika Operativne grupe *B. amyloliquefaciens* i ostalih predstavnika *B. subtilis* kompleksa (Fan et al., 2017) izolata iz prirode dostupnih u NCBI bazi (Prilog 36). Genomi su analizirani u web serveru Type Strain Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff & Göker, 2019) u kome je filogenetsko stablo konstruisano na osnovu vrednosti digitalne DNK-DNK hibridizacije (dDDH). Vrednost dDDH veća od 70% korišćena je kao prag za pripadnost istoj *Bacillus* spp. vrsti. Balansirano filogenetsko stablo minimalne evolucije (eng. *balanced minimum evolution phylogenetic tree*) konstruisano je na osnovu dDDH vrednosti uzetih za vrednost evolutivnih distanci putem programa FastME v2.1.6.1

sa *Subtree Pruning and Regrafting* korekcijom u okviru TYGS programa. Filogenetska analiza je urađena sa i bez referentnih sojeva iz TYGS baze. Pored DDH vrednosti, u filogenetskoj analizi korišćene su i vrednosti prosečne sličnosti nukleotida (eng. *Average Nucleotide Identity* - ANI), takođe izračunate u TYGS web serveru. Za svrstavanje dva *Bacillus* spp. u istu vrstu primenjen je prag od 95% ANI, a filogenetsko stablo - *Bio-Neighbour Joining* (BIONJ) konstruisano je na osnovu ANI vrednosti uzetih za filogenetske distance. Za diferencijaciju *Bacillus* spp. na nivou podvrste primenjene su vrednosti 79% dDDH i 97% ANI.

Komparativna genetička analiza soja SS-38.4 i sojeva koji su pokazali najveću sličnost i srodnost sa genomom SS-38.4 urađena je u EDGAR 3.0 programu za autorizovane projekte (Dieckmann et al., 2021). Analiza je obuhvatala identifikaciju osnovnog genoma (eng. *core genome*), pan-genoma i jedinstvenih gena (eng. *singletons*), kao i KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) i COG (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*) funkcionalnu anotaciju genskih klastera.

3.9.3 Mapiranje gena za PGP osobine, kolonizaciju biljaka, biokontrolnu aktivnost i adaptaciju na negativne faktore sredine

Genom soja SS-38.4 analiziran je u cilju identifikacije gena uključenih u različite mehanizme: PGP aktivnost, biokontrolu, sintezu antimikrobnih jedinjenja, QQ aktivnost posredovanu acil-homoserin laktonezama, produkciju ekstracelularnih enzima, kolonizaciju biljaka i adaptaciju na negativne uslove u filozferi. Genom soja P21 (GCA_018530765.1) analiziran je na prisustvo gena za PGP osobine, kolonizaciju biljaka i QS aktivnost. Detaljna analiza gena odgovornih za virulenciju ovog biljnog patogena prikazana je u Ranković et al. (2023).

Vršena je pretraga prisustva gena za sledeće PGP osobine: solubilizaciju minerala (fosfata, cinka, mangana, kalijuma i gvožđa), sintezu indol-3-sirćetne kiseline (IAA), cijanovodonika (HCN), amonijaka i aktivnost aminociklopropan-karboksilat (ACC) deaminaze. Od gena uključenih u kolonizaciju biljaka, traženi su geni za produkciju surfaktina, sintezu biofilma i pokretljivost. Geni sa ulogom u adaptaciji na uslove u filozferi, identifikovani su na osnovu funkcionalne anotacije RAST i PGAP sistemima i obuhvatali su sledeće: adaptacije na UV zračenje, isušivanje, nedostatak hranljivih materija i oksidativni stres.

Predikcija biosintetičkih klastera za neribozomalno sintetisane proteine sa antimikrobnom aktivnošću u SS-38.4 genomu, izvršena je primenom AntiSMASH 7.0 (Blin et al., 2023) web servera, sa svim označenim parametrima podešenim na "relaxed" opciju. *Minimal Information about Biosynthetic Gene Cluster Repository* 2.0 (Kautsar et al., 2020) primenjen je za anotaciju identifikovanih klastera. Sekvence genskih klastera čiji metabolički produkti nisu identifikovani, poređene su sa NCBI bazom putem BLAST funkcije. BAGEL4 web server (van Heel et al., 2018) korišćen je za identifikaciju bakteriocina i ribozomalno sintetisanih proteina (RiPPs).

Predikcija potencijalnih genomskih ostrva u koje su grupisani geni za virulenciju i rezistentnost na antibiotike genoma SS-38.4, urađena je u Island Viewer 4 (Bertelli et al., 2017) web serveru, poređenjem sa *B. velezensis* FZB42 kao referentnim genomom.

4. REZULTATI

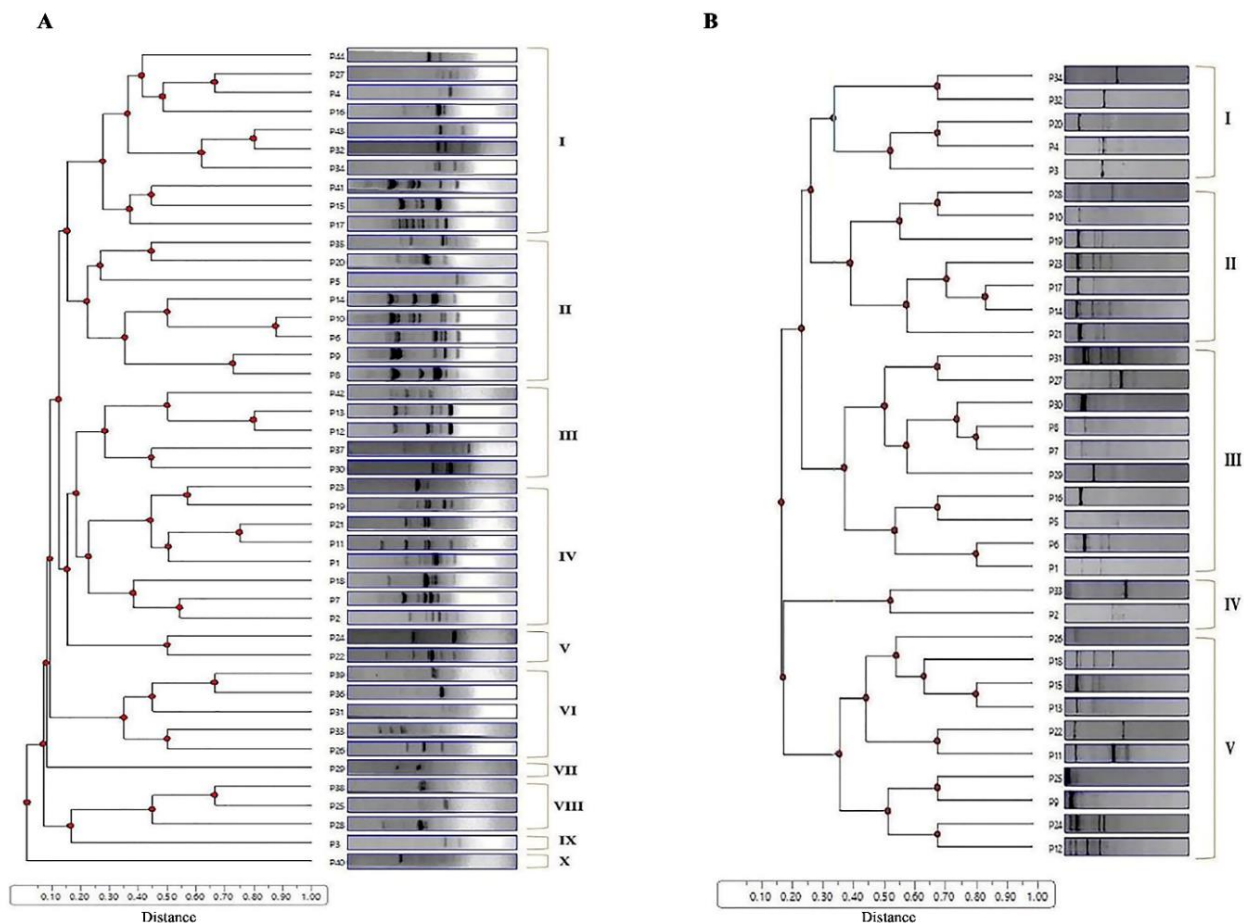
4. REZULTATI

4.1 Odabir najbolje metode za genetičko profilisanje i procenu diverziteta *Bacillus* spp. izolata iz prirode

Od 14 testiranih rep i RAPD prajmera, sa osam je postignuto umnožavanje dovoljnog broja nasumičnih i repetitivnih sekvenci u većini izolata, neophodnih za dalju analizu. Prajmeri koji su se pokazali uspešni u genetičkom profilisanju 251 *Bacillus* spp. izolata bili su: BOX-A1R, (GTG)₅, ERIC 1R i ERIC 2, RAPD272, OPB 07, OPO 02, OPG 5 i RAPD 1247. Ostali prajmeri nisu umnožavali sekvence kod više od polovine izolata, dok kod onih koji jesu, broj uočenih amplikona nije bio veći od tri, tako da su označeni kao nepogodni za genetičko profilisanje *Bacillus* spp. izolata iz prirode.

Diskriminatorne sposobnosti osam navedenih prajmera u proceni diverziteta *Bacillus* spp. su upoređene na osnovu šest različitih parametara. Među rep prajmerima uočeno je 48 različitih genetičkih profila sa BOX-A1 prajmerom, 55 sa (GTG)₅ i 30 sa ERIC 1R i ERIC 2 prajmerima. Broj različitih genetičkih profila dobijenih sa RAPD prajmerima iznosio je redom: 44 sa RAPD 272, 34 sa OPB 07, 19 sa OPO 02, 55 sa OPG 5 i 34 sa RAPD 1247. Slike agaroznih gelova sa obeleženim sojevima koji dele isti genetički profil date su u Prilozima 1-8.

Na osnovu granične vrednosti 0,2 izračunate u CLIQS 1D softveru, slični profili su grupisani u klastere dendrograma, predstavljajući tako sličnost između sojeva. Najveći broj klastera (I-X) izdvojen je RAPD 272 prajmerima (Slika 10A), a najmanji (I-V) RAPD 1247 (Slika 10B) i ERIC 1R i ERIC 2 prajmerima (Prilog 9). Za ostale prajmere broj klastera je bio sledeći: I-IX BOX-A1R, I-VI (GTG)₅ i OPO 02, I-VIII OPB 07 i OPG 5 (Prilozi 9-10).



Slika 10. Poređenje dva prajmera u genetičkom profilisanju i proceni diverziteta *Bacillus* spp. izolata iz prirode. Prikazani su dendrogram dobijen RAPD 272-PCR metodom, koja se pokazala kao metoda izbora u proceni diverziteta *Bacillus* spp. (A) i dendrogram dobijen najmanje uspešnom metodom - RAPD 1247 (B). Preuzeto iz Rosić et al. (2023).

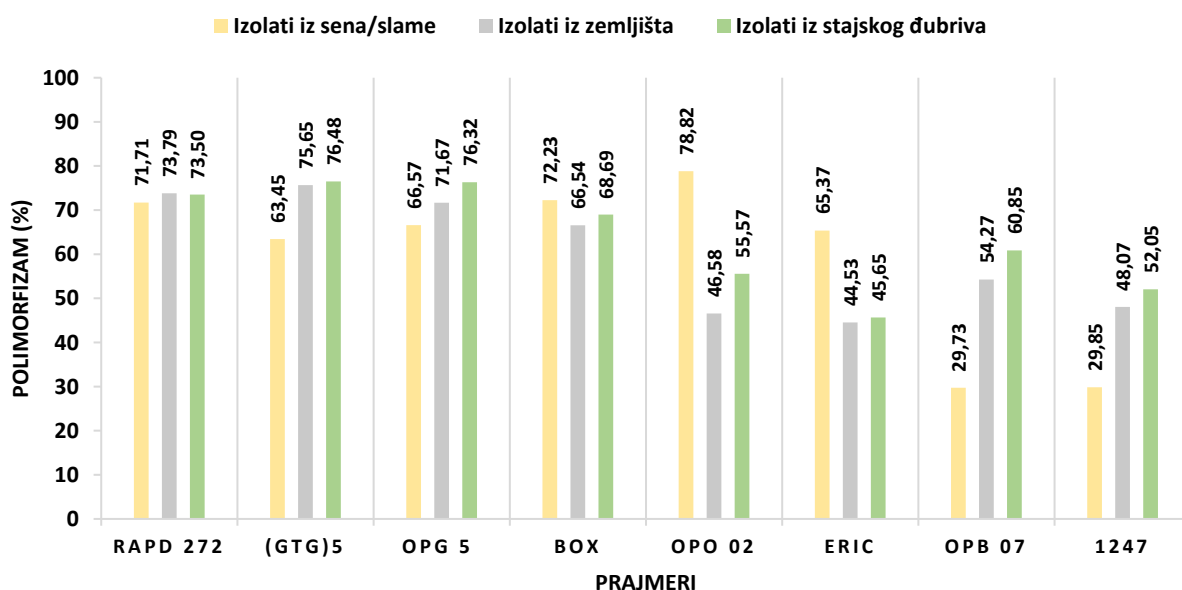
Izostanak umnožavanja sekvenci uočen je kod 19 izolata sa BOX-A1R prajmerima, 70 sa ERIC 1R i ERIC 2 i samo jednog sa (GTG)₅ prajmerima. RAPD prajmerima nisu amplifikovane sekvence kod 17 izolata sa RAPD 272, 65 sa OPB 07, 67 sa OPO 02, 9 sa OPG 5 i 127 sa RAPD 1247 prajmerima.

Na osnovu diskriminacionog indeksa (D), koji je za sve rep i RAPD metode imao vrednost veću od 0,9 (Tabela 4), potvrđeno je da se rezultati genetičkog profilisanja mogu tumačiti sa visokom pouzdanošću (Hunter & Gaston 1988). Sumirani rezultati ukupnog broja i veličina amplikona (traka) umnoženih svakim prajmerom, broja jedinstvenih traka i izračunate srednje vrednosti polimorfizma, prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Parametri na osnovu kojih je određena uspešnost prajmera u proceni diverziteta *Bacillus* spp. kroz genetičko profilisanje. Najviše vrednosti u okviru kolona Polimorfizam i D indeks označene su crveno, a najniže belo.

| Prajmer | Ukupan broj traka | Opseg veličina traka (kb) | Polimorfizam (srednja vrednost) | D indeks | Broj jedinstvenih traka | Izolat/soj i veličina jedinstvene trake (kb) |
|--------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------------|----------|-------------------------|--|
| RAPD 272 | 1 - 8 | 0.5 - 9 | 0,7171 | 0,9683 | 1 | SS- 12.6 (0,5) |
| (GTG)₅ | 1 - 7 | 0.4 - 10 | 0,7186 | 0,9478 | 2 | SS- 32.6 (0,5); SS- 9.3 (0,6) |
| OPG 5 | 1 - 6 | 0.1 - 3 | 0,7152 | 0,9676 | 2 | SS- 38.4 (3); SS- 6.6.1 (0,3) |
| BOX | 1 - 9 | 0.1 - 10 | 0,6925 | 0,9619 | 0 | / |
| OPO 02 | 1 - 5 | 0.7 - 10 | 0,6032 | 0,9253 | 1 | SS- 8.1.2 (0,5) |
| ERIC | 1 - 6 | 0.2 - 3 | 0,5185 | 0,9470 | 0 | / |
| OPB 07 | 1 - 6 | 0.2 - 3 | 0,4829 | 0,9390 | 1 | SS- 38.4 (0,5) |
| RAPD 1247 | 1 - 5 | 0.4 - 3 | 0,4332 | 0,9392 | 0 | / |

Polimorfizam između izolata izračunat je prvo posebno za svaku grupu iz koje izolati vode poreklo (zemljište, seno i slama i stajsko đubrivo) (Slika 11), a zatim i za celu kolekciju kao srednja vrednost polimorfizama ovih grupa. Prajmeri OPO 02, RAPD 272 i BOX-A1R su se pokazali kao najbolji izbor za genetičko profilisanje i procenu diverziteta *Bacillus* spp. izolata iz sena i slame, dok su prajmeri izbora za izolate iz zemljišta i stajskog đubriva redom bili: RAPD 272, (GTG)₅ i OPG5. Na osnovu poređenja svih parametara, prajmer RAPD 272 je pokazao najbolju diksriminatorsnu moć u proceni diverziteta *Bacillus* spp. izolata iz prirode.



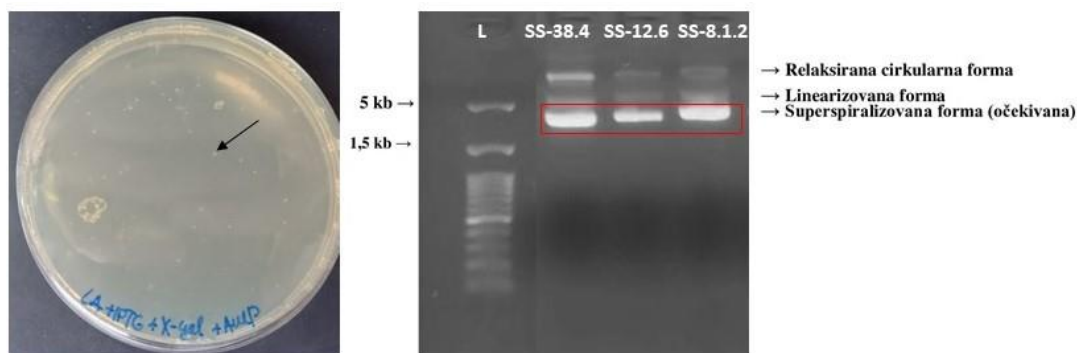
Slika 11. Poređenje uspešnosti prajmera u proceni genetičkog polimorfizma između *Bacillus* spp. izolata poreklom iz različitih prirodnih staništa: sena/slame (žuto), zemljišta (sivo) i stajskog đubriva (zeleno). Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2023).

4.2 Dizajn i odabir SCAR prajmera za specifičnu detekciju biokontrolnog soja

Iako je uočen veći broj soj-specifičnih profila dobijenih umnožavanjem sa osam različitih prajmera, položaji pojedinačnih traka su se poklapali sa položajima traka u drugim profilima. Ukupno sedam jedinstvenih sekvenci, neophodnih za dizajn soj-specifičnih SCAR prajmera,

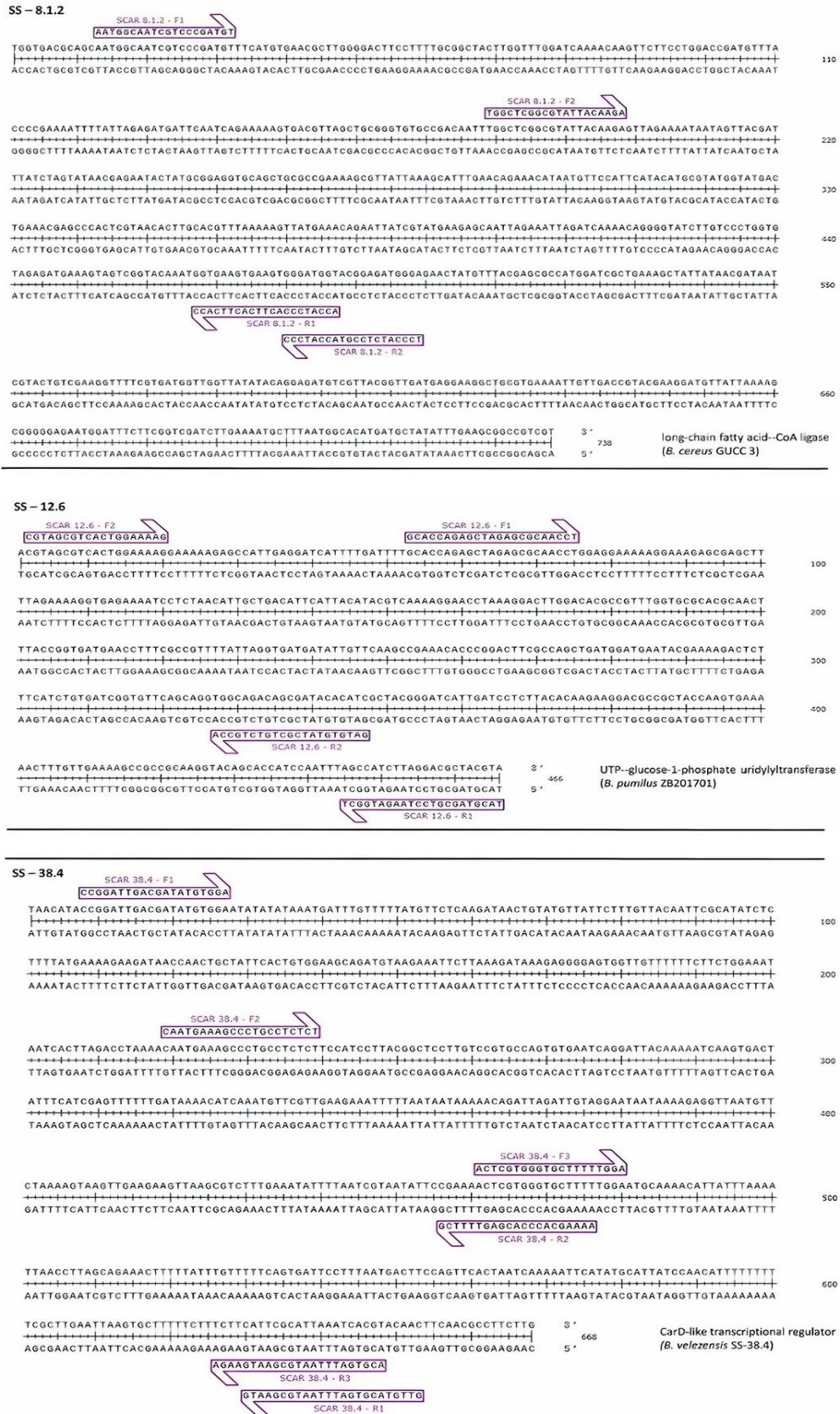
umnoženo je sa pet rep i RAPD prajmera (RAPD 272, (GTG)₅, OPG 5, OPO 02 i OPB 07) kod šest izolata/sojeva (Tabela 4, Prilozi 1-10). Među njima su tri soja sa dokazanom biokontrolnom aktivnošću - *B. velezensis* SS-38.4, *B. amyloliquefaciens* SS 12.6 i *B. pumilus* SS-8.1.2 (Dimkić et al., 2015; Dimkić et al., 2017; Nikolić et al., 2019). Za soj SS-38.4 uočene su dve jedinstvene trake, jedna od 3 kb sa OPG 5 i od 0,5 kb sa OPB 07 prajmerom. Međutim, zbog ograničenja ddPCR u pogledu veličine fragmenta koji može biti umnožen SCAR prajmerima (Watry et al., 2020), traka od 3 kb, kao predugačka, nije razmatrana za dalju analizu.

Jedinstvene sekvence biokontrolnih sojeva SS-38.4, SS-12.6 i SS-8.1.2 su uspešno klonirane, što je potvrđeno rastom belih kolonija *E. coli* DH5α na LA+IPTG+X-gal+Amp i izolacijom plazmida odgovarajuće veličine iz kolonija (Slika 12).



Slika 12. Uspešna ligacija, transformacija i kloniranje jedinstvenih DNK sekvenci sojeva SS-38.4, SS-12.6 i SS-8.1.2. Bele transformisane kolonije označene su strelicom (levo). Nakon izolacije plazmidne DNK iz belih kolonija uočena je traka veličine oko 3 kb, koja odgovara vektoru sa ligiranim jedinstvenom sekvencom (desno). L – molekularni marker veličine 5 kb (eng. *DNA ladder*, NEB, SAD) (foto I. Rosić)

Nakon sekvenciranja jedinstvenih sekvenci, dizajnirani su SCAR prajmeri, čije su pozicije vezivanja u sekvencama prikazane na Slici 13. *In silico* PCR analiza je pokazala odsustvo hibridizacije svih prajmera za odabrane genome *E. coli*, čime je isključeno nespecifično umnožavanje potencijalno prisutne rezidualne DNK nakon prečišćavanja polimeraze. SCAR prajmeri u kombinaciji MIX 9 (Tabela 2) za soj SS-38.4 pokazali su najveću specifičnost. Očekivani amplikon veličine 646 bp, koji odgovara jedinstvenoj sekvenci SS-38.4, uočen je kod 58 od 251 izolata iz kolekcije (Prilog 11). Druga kombinacija prajmera sa najvećom specifičnošću bila je MIX 7 za SS-12.6, koji su umnožavali amplikon veličine 465 bp kod 107 izolata (Prilog 12). Ostale kombinacije prajmera nisu pokazale značajnu specifičnost za odgovarajuće jedinstvene sekvence sojeva, usled prisustva nespecifičnih amplikona ili amplikona veličine jedinstvenih sekvenci kod više od 70% ostalih izolata. Na osnovu pokazanog najvišeg nivoa specifičnosti za dalje testove izabrani su prajmeri SCAR_{38.4}-F1 and SCAR_{38.4}-R1 (MIX 9) za specifičnu detekciju soja SS-38.4. Pored biokontrolne aktivnosti, karakteristična fenotipska osobina, oreol oko kolonija na Chromogenic *Bacillus* agaru sa dodatkom polimiksina (Slika 9B), omogućila je razlikovanje SS-38.4 od ostalih 58 izolata prema kojima su SCAR prajmeri pokazali specifičnost.



Slika 13. Jedinstvene sekvence sa dizajneranim SCAR prajmerima: Jedinstvena sekvenca *B. pumilus* SS-8.1.2, identifikovana u NCBI BLAST analizi kao gen za ligazu dugolančanih masnih kiselina-CoA; Sekvenca *B. amyloliquefaciens* SS-12.6, gen za UTP-glukoza-1-fosfat uridililtransferazu i sekvenca *B. velezensis* SS-38.4, gen za CarD-nalik transkripcioni regulator, identifikovan nakon anotacije genoma. Preuzeto iz Rosić et al. (2025b).

4.3 Optimizacija SCAR_{38,4}-ddPCR metode

Umnožavanje i detektovanje DNK sekvence duge 646 bp specifične za soj SS-38.4 ddPCR metodom, zahtevalo je optimizaciju metode usled tri puta veće dužine ciljane sekvence od uobičajeno umnožavanih ovom metodom.

U prvom koraku optimizacije, u kome su testirane četiri različite temperature hibridizacije (63; 60,4; 58,8; i 56 °C), amplifikacija ciljane sekvence pozitivne kontrole SS-38.4 bila je jako slaba. Broj kapljica koje su sadržale umnoženu DNK (pozitivne kapljice) iznosio je od jedne do deset. Kako to odgovara rasponu koncentracija ciljane DNK od 0,687 do 6,684 kopija/μl po reakciji, određivanje optimalne temperature hibridizacije u ovom koraku nije bilo moguće (Prilog 13).

Pod istim uslovima amplifikacije, testirana je temperatura hibridizacije od 58,4 °C. Koncentracija ciljane DNK bila je još niža (1,455 kopija/μl po reakciji). Takođe je detektovan relativno veliki broj pozitivnih kapljica (12) u kontroli bez matrice (NTC) u odnosu na 17 detektovanih u pozitivnoj kontroli (Prilog 14).

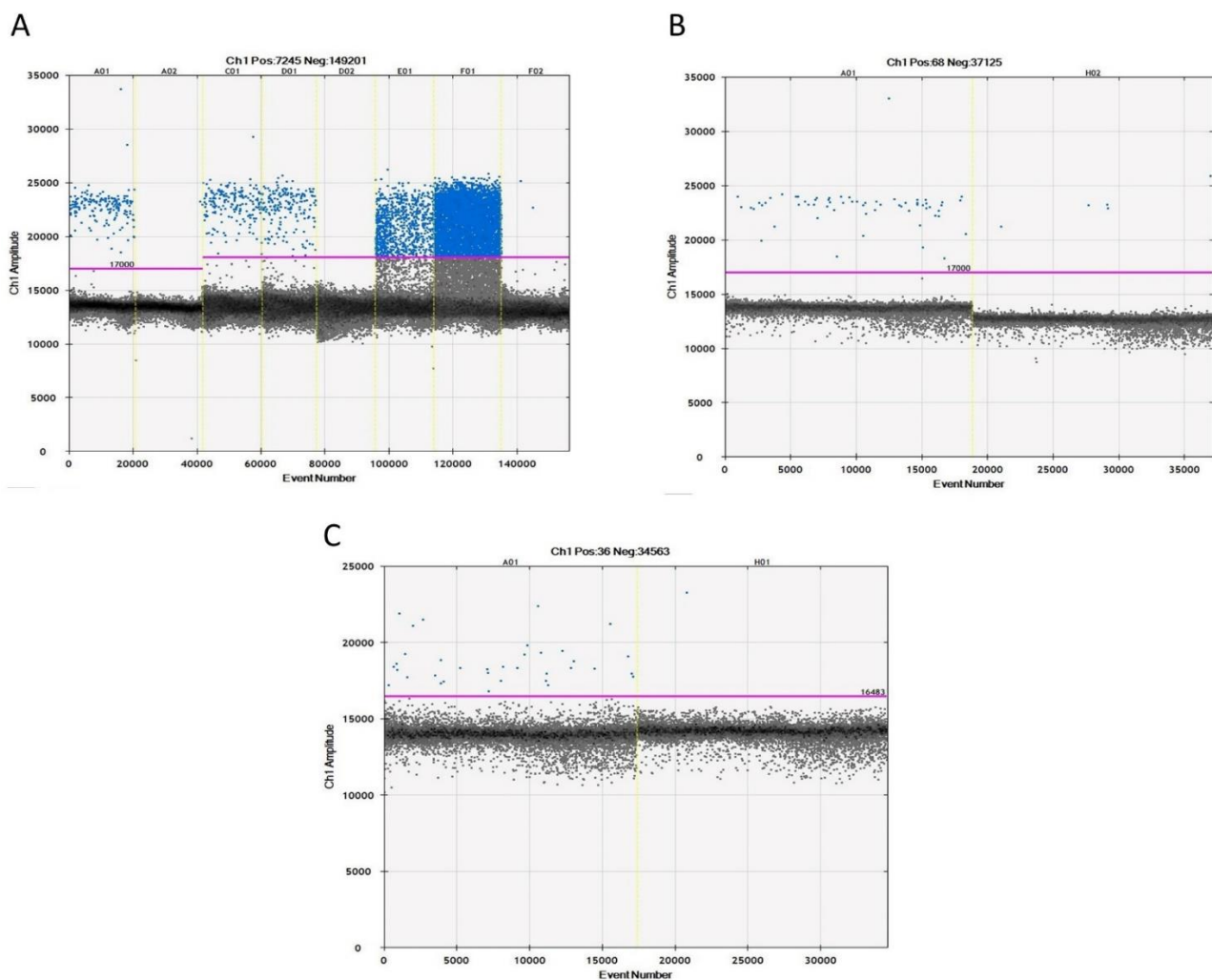
Zbog potencijalnog prisustva inhibitora, u narednom koraku pozitivna kontrola je razblažena. Takođe, u testiranje je dodata i negativna kontrola, odnosno DNK izolovana iz listova šećerne repe koji nisu bili podvrgnuti tretmanima. Rezultati amplifikacije su ponovo bili nezadovoljavajući, sa brojem pozitivnih kapljica od 13 do 22 i odgovarajućim niskim koncentracijama DNK od 0,990 do 1,665 kopija/μl po reakciji. Pozitivne kapljice su ponovo uočene u NTC, dok je za negativnu kontrolu rezultat bio očekivan, bez nespecifičnog umnožavanja biljne DNK (Prilog 15).

Sledeći korak u optimizaciji obuhvatao je testiranje umnožavanja različitih koncentracija razblažene DNK pozitivne kontrole, pri produženom vremenu hibridizacije od 6 min, na temperaturi od 59 °C. Takva modifikacija protokola je rezultirala znatno većim brojem pozitivnih kapljica u pozitivnoj kontroli (63), uz njihovo smanjenje u NTC (4) (Prilog 16). Kako bi se utvrdila optimalna temperatura hibridizacije, ponovo je testirana amplifikacija pod temperaturnim gradijentom (53; 56; 59 i 65 °C), uz produženo vreme trajanja. Na osnovu analize grafika (jasnoće razdvajanja pozitivnih i negativnih kapljica) i izračunavanja koncentracije DNK, utvrđeno je da najbolji rezultat pokazuje hibridizacija na 65 °C (Slika 14A, Prilog 17).

Uslovi amplifikacije optimizovani za pozitivnu kontrolu, dalje su primenjeni na uzorke ekstrahovane DNK soja SS-38.4 izolovanog iz filofsere u različitim vremenskim intervalima. Testirana su različita razblaženja uzoraka, kao i različite temperature hibridizacije. Međutim, najbolji rezultati su dobijeni pri umnožavanju nerazblaženih uzoraka (Prilog 17).

Kako bi se utvrdilo da li je uspešnost umnožavanja posledica produženja vremena hibridizacije sa jednog na šest minuta, izvršeno je uporedno testiranje umnožavanja DNK pozitivne kontrole i NTC pri različitim vremenima hibridizacije. Razlike između standardnog i produženog vremena umnožavanja jasno se mogu uočiti na osnovu broja pozitivnih kapljica iznad praga amplitude fluorescencije (Slika 14 B i C, Prilog 18).

Nakon sumiranja svih rezultata, utvrđeno je da modifikacija ddPCR programa, koja obuhvata produženo vreme hibridizacije, 2 μl DNK 5 × razblažene pozitivne kontrole i koncentrovanih uzoraka, na 65 °C, predstavlja optimalni SCAR_{38,4}-ddPCR protokol. Izračunate koncentracije ekstrahovane DNK SS-38.4 iz uzoraka filofsere date su u Prilogu 19.



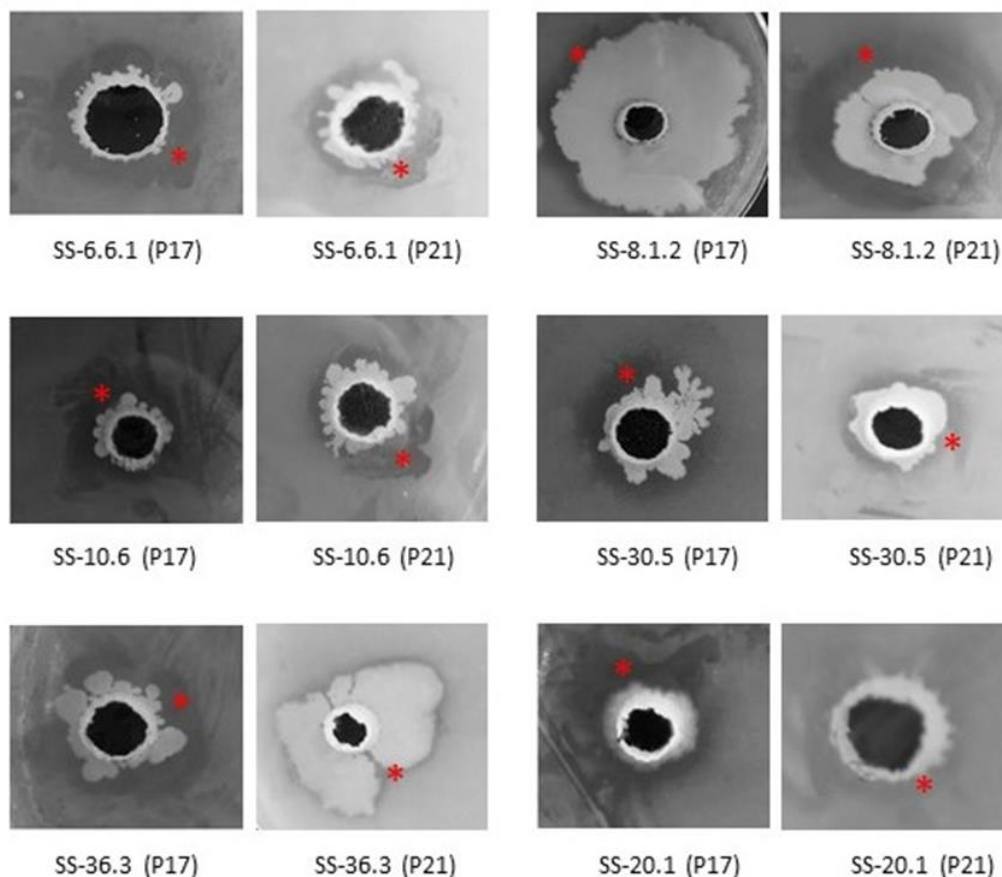
Slika 14. Optimizacija SCAR38.4-ddPCR metode. Na slici A prikazan je 1-D grafik na kome se uočava distribucija kapljica nakon ddPCR gradijenta temperature: A01 (C+, 65 °C), A02 (NTC, 65 °C), C01 (C+, 62 °C), D01 (C+, 59 °C), D02 (NTC, 59 °C), E01 (C+, 56 °C), F01 (C+, 53 °C), F02 (NTC, 53 °C). Grafici B i C pokazuju razlike u broju i distribuciji kapljica nakon amplifikacije DNK pozitivne kontrole i NTC, pri različitim vremenima trajanja hibridizacije, na optimalnoj temperaturi od 65 °C: produžena hibridizacija od 6 min (B) i standardna hibridizacija od 1 min (C). Preuzeto iz Rosić et al. (2025b).

4.4 *In vitro* biokontrolna aktivnost *Bacillus* spp. sojeva

4.4.1 Biokontrolna aktivnost supernatanta i lipopeptidnih ekstrakata

Pored tri dokazana biokontrolna soja *B. velezensis* SS-38.4, *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i *B. pumilus* SS-10.7, supernatanti još 11 izolata su pokazali inhibitornu aktivnost prema P21 soju i devet prema P17 soju, od 248 testiranih izolata. Izolati čiji su supernatanti pokazali antagonističku aktivnost u *well-diffusion* testu protiv P21, na osnovu prečnika zone inhibicije bili su sledeći: SS-12.1 (14,5 mm); SS-10.6 (20,1 mm); SS-8.1.2 (18 mm); SS-10.4.1 (11 mm); SS-8.2.2 (10,6 mm); SS-9.4 (12,9 mm); SS-30.5 (18,5 mm); SS-36.3 (19,3 mm); SS-6.6.1 (20,5 mm); SS-20.1 (18,7 mm) i SS-12.7 (13,8 mm). S druge strane, izolati čiji su supernatanti pokazali aktivnost protiv P17 bili su: SS-8.2.2 (10,5 mm); SS-30.5 (20,3 mm); SS-20.1 (21,2 mm); SS-36.3 (22 mm); SS-6.6.1 (21,5 mm); SS-10.6 (23,1 mm); SS-12.1 (15,6 mm); SS-8.1.2 (19,4 mm). Supernatanti izolata koji su pokazali inhibitornu aktivnost protiv oba *P. syringae* pv. *aptata* soja i prečnik zone inhibicije veći od 17 mm (Slika 15), izabrani su za etil-acetatnu ekstrakciju lipopeptida.

Za određivanje MIK i MBK vrednosti izabrani su izolati koji su pokazali inhibitornu aktivnost protiv oba *P. syringae* pv. *aptata* soja i prečnik zone inhibicije veći od 17 mm (Slika 15). Najjači efekat na sojeve biljnog patogena ostvario je ekstrakt SS-8.1.2, sa MIK vrednostima 0,3125 mg/ml protiv P21 i 0,15625 mg/ml protiv P17 (Tabela 5). Takođe, ekstrakt ovog izolata je jedini pokazao baktericidno dejstvo na oba soja *P. syringae* pv. *aptata*.



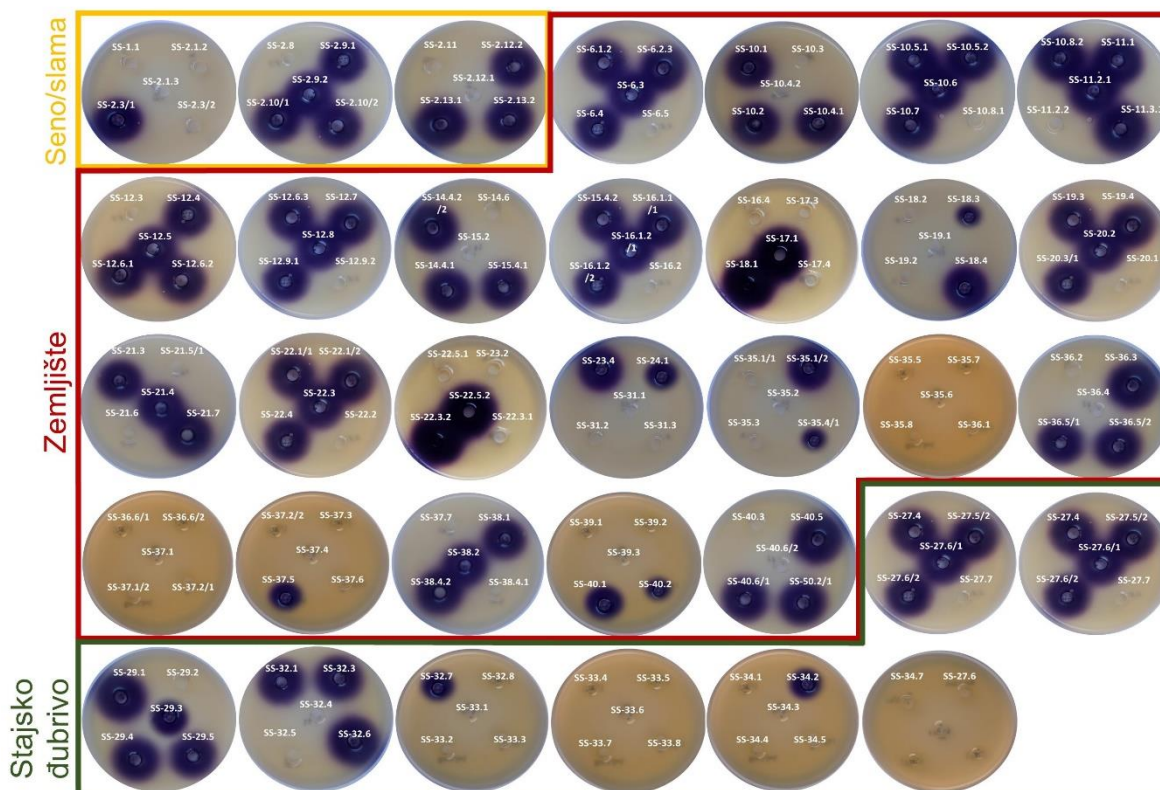
Slika 15. Zone inhibicije (prosvetljene zone, obeležene zvezdicom) fitopatogenih sojeva *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P17 i P21 prouzrokovane aktivnošću šest *Bacillus* spp. sojeva izabranih za etil-acetatnu ekstrakciju lipopeptida (foto I. Rosić).

Tabela 5. Vrednosti MIK i MBK etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida šest *Bacillus* spp. sojeva prema sojevima *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* P17 i P21. Ekstrakti koji nisu ispoljili inhibitorni i baktericidni efekat pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 5 mg/ml obeleženi su kosom crtom.

| Soj | MIC (P21) | MIC (P17) | MBC (P21) | MBC (P17) |
|----------|------------|------------|-----------|------------|
| SS-6.6.1 | 20 mg/ml | 10 mg/ml | / | / |
| SS-8.1.2 | 0,31 mg/ml | 0,17 mg/ml | 5 mg/ml | 2,50 mg/ml |
| SS-10.6 | 5 mg/ml | 5 mg/ml | / | / |
| SS-30.5 | 10 mg/ml | 5 mg/ml | / | / |
| SS-36.3 | 5 mg/ml | 2,50 mg/ml | / | 5 mg/ml |
| SS-20.1 | 10 mg/ml | 5 mg/ml | / | / |

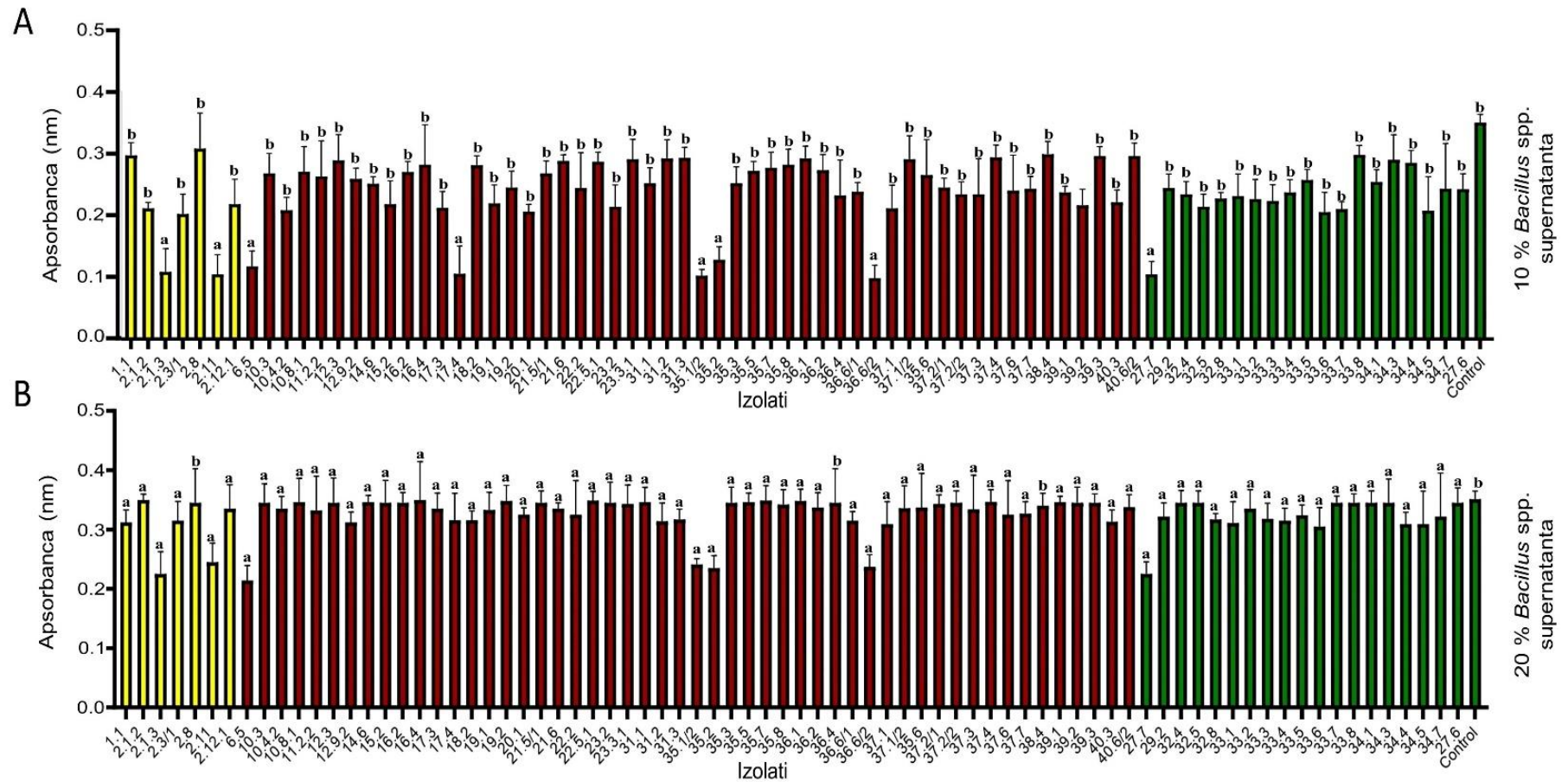
4.4.2 Biokontrolna aktivnost preko *quorum quenching* mehanizma

Testiran je ukupno 251 *Bacillus* spp. izolat, od kojih se kod 78 izolata nije pojavio ljubičasti prsten violaceina u *well-diffusion* testu razgradnje C₆-HSL (Slika 16, Prilog 22). Najveći broj AHL-laktonaza-pozitivnih izolata bio je poreklom iz zemljišta (52), dok je iz sena iz slame i stajskog đubriva broj izolata bio redom sedam i 19.



Slika 16. Aktivnost AHL-laktonaza i njihova raspodela kod *Bacillus* spp. izolata. Aktivnost AHL-laktonaza uočena kroz odsustvo ljubičastog pigmента oko bunarića koji su sadržali supernatante pozitivnih sojeva. Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025a).

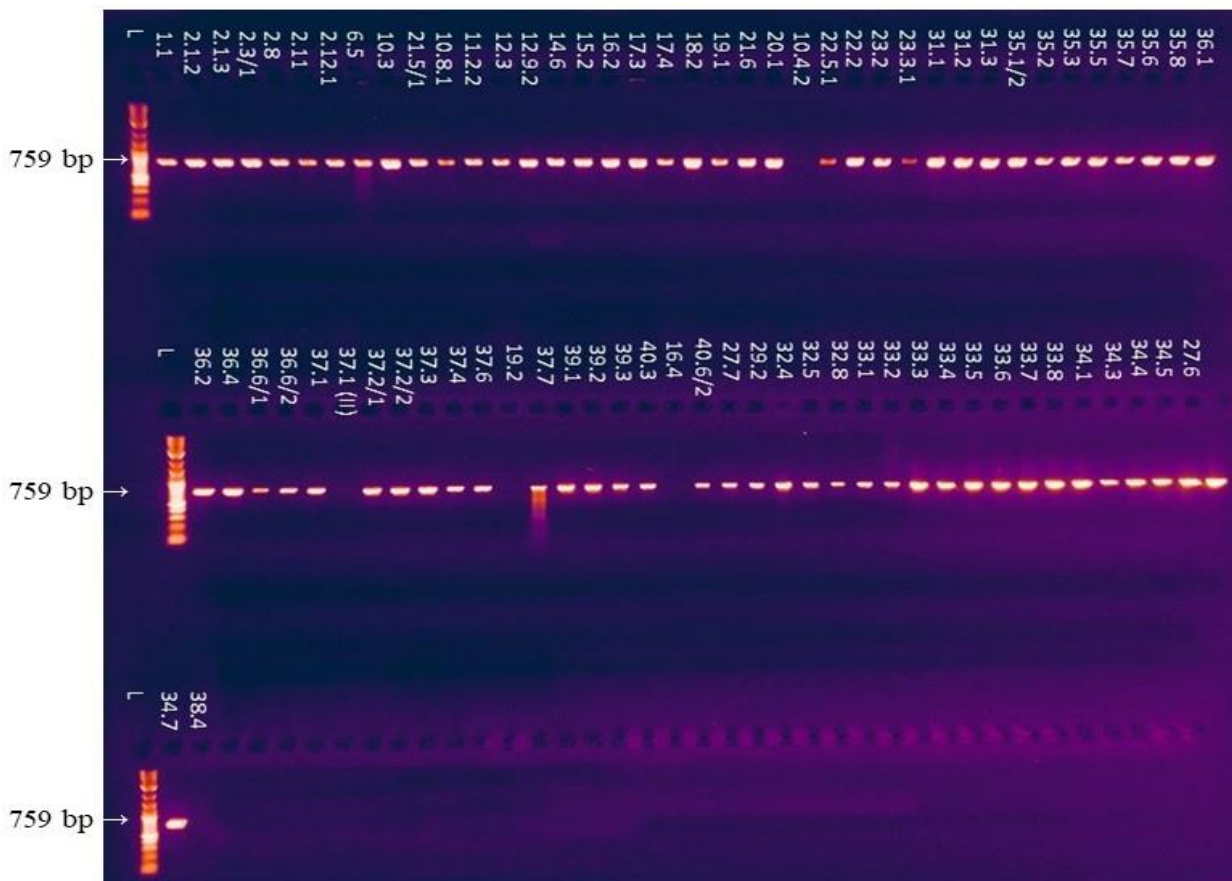
QQ aktivnost 78 izolata, testirana je na osnovu vrednosti inhibicije sinteze violaceina (Prilog 23). Apsorbance uzoraka koji su sadržali po 5% supernatanta pozitivnih izolata bile su bliske negativnoj kontroli (A_{585} 0,351). Kako ni jedan supernatant dodat u koncentraciji od 5%, nije pokazivao značajne razlike u apsorbanci u odnosu na negativnu kontrolu (Prilog 24), ovi rezultati nisu dalje analizirani. Međutim, pri testiranju 10% supernatanta, osam izolata je pokazalo značajno niže vrednosti apsorbance u odnosu na negativnu kontrolu: jedan izolat iz stajskog đubriva (SS-27.7), dva izolata iz sena (SS-2.1.3 i SS-2.11) i pet izolata iz zemljišta (SS-6.5, SS-17.4, SS-35.1/2, SS-35.2 i SS-36.6/2) (Slika 17A, Prilog 25). Pri dodatku 20% supernatanta, 76 uzoraka je pokazalo značajno niže vrednosti apsorbance u odnosu na kontrolu, tako da su te vrednosti korišćene u izračunavanju procenta inhibicije violaceina (Slika 17 B, Prilog 26). Najveći procenat inhibicije sinteze violaceina primećen je za supernatant soja SS-36.6/2 (71,7%), a najniži (14,52%) za soj SS-38.4 (Prilog 27).



Slika 17. Apsorbanca produkovanog violaceina nakon dodatka supernatanta *Bacillus* spp. sa *quorum quenching* aktivnosti. Supernatanti osam izolata su doveli do značajnog smanjenja apsorbance violaceina, pri koncentraciji od 10% (A); Pri koncentraciji od 20% supernatanta, u 76 uzoraka je uočeno smanjenje apsorbance (B). Žuto obeleženi su izolati iz sena/slame, crveno iz zemljišta i zeleno iz stajskog đubriva. Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025a).

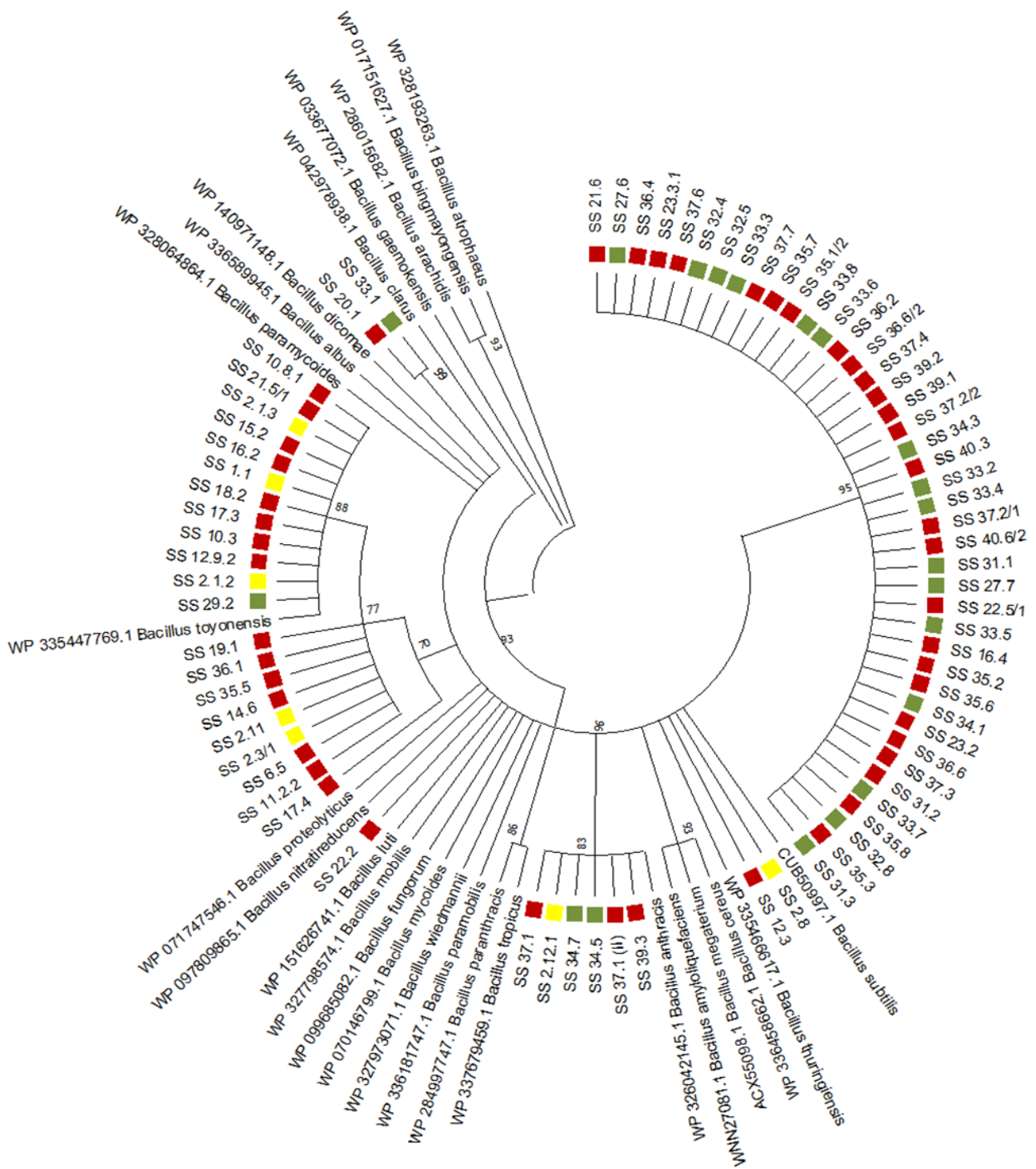
4.4.3 Molekularni i funkcionalni diverzitet AHL-laktonaza *Bacillus* spp. izolata iz različitih prirodnih staništa

Kod 74 od 78 izolata iz kolekcije koji su pokazali QQ aktivnost umnožen je gen za *aiiA* laktonazu, specifičnu za rod *Bacillus* (Slika 18). Međutim, kod četiri izolata iz zemljišta *Bacillus* sp. SS-10.4.2, SS-16.4, SS-19.2, i *B. velezensis* SS-38.4, nije pokazano prisustvo *aiiA* gena. Na osnovu analize sekvence genoma *B. velezensis* SS-38.4, utvrđeno je da je tip laktonaze prisutan kod ovog soja YtnP AHL-laktonaza.



Slika 18. Rezultati amplifikacije *aiiA* gena veličine 759 bp. AiiA AHL-laktonazu poseduje 74 od 78 izolata sa QQ aktivnošću. L – molekularni marker veličine 10 kb (*DNA ladder*, NEB, SAD). Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025a).

Filogenetska analiza 74 *in silico* translirane sekvence gena za laktonaze pokazala je veliku sličnost između izolata i pored razlika u tipovima staništa i lokalitetima izolacije. Više od polovine izolata (26 iz zemljišta i 16 iz stajskog đubriva) obrazovalo je poseban klaster, odvojen od referentnih NCBI sojeva (Slika 19). Jedan izolat iz sena (SS-2.8) i dva iz zemljišta (SS-12.3 i SS-22.2) izdvojili su se u vidu pojedinačnih grana filogenetskog stabla. Šest izolata (jedan iz sena, dva iz stajskog đubriva i tri iz zemljišta) pokazali su sličnost sa sekvencom AiiA laktonaze *B. anthracis* iz NCBI baze, obrazujući zajednički klaster. Takođe, 12 izolata (jedan iz stajskog đubriva, tri iz sena i osam iz zemljišta) grupisani su zajedno sa *B. toyonensis*, dok je devet (dva iz sena i sedam iz zemljišta) pokazalo veliku sličnost sekvence sa istim referentnim sojem. Generalno, izolati su pokazali srodnost sa AiiA sekvencama sojeva *B. subtilis* i *B. cereus* kompleksa vrsta, koji su dominantni u staništima iz kojih analizirani izolati vode poreklo (Slika 19).

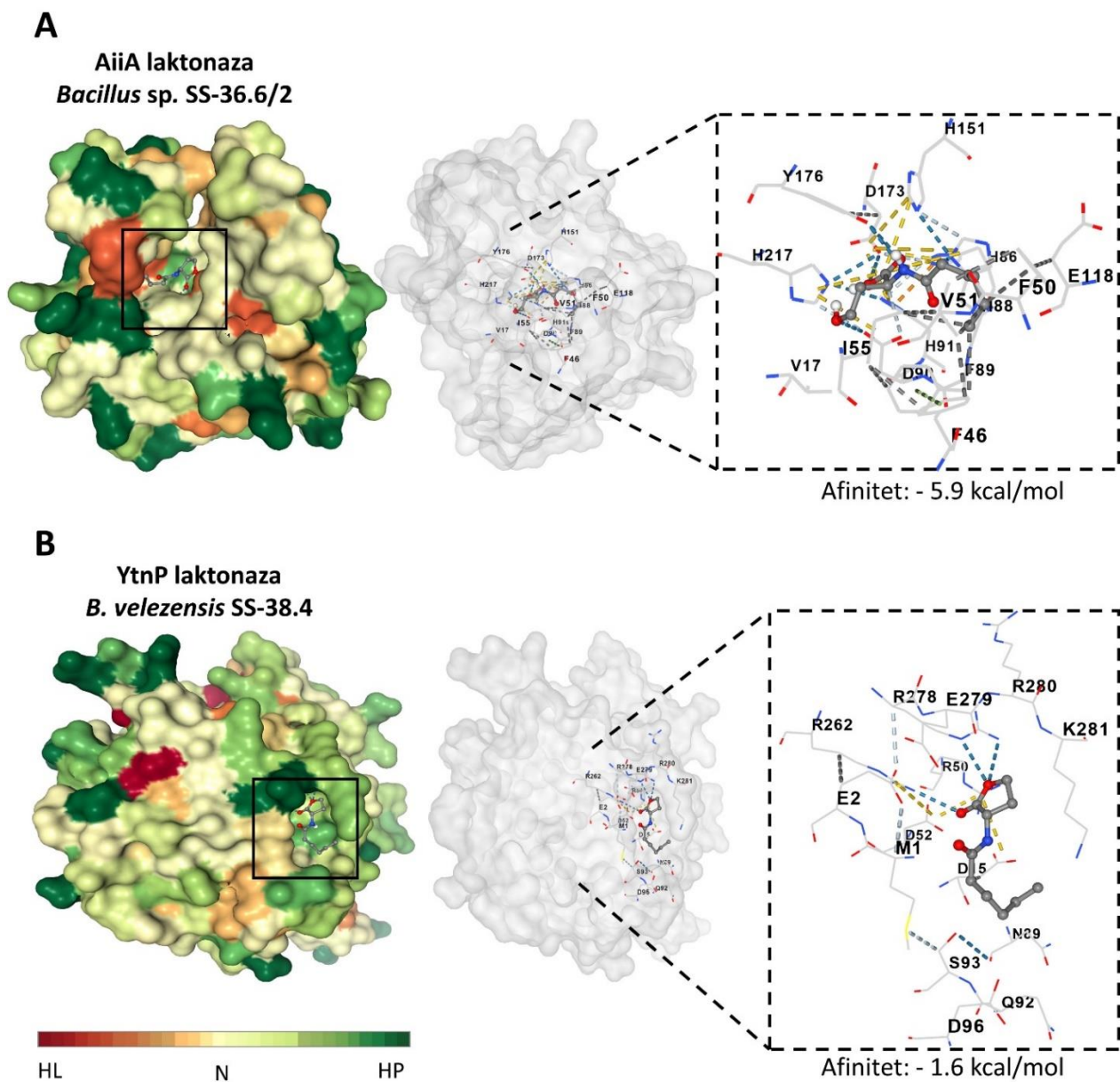


Slika 19. Filogenetski odnosi *Bacillus* spp. izolata (crveni kvadratići označavaju izolate iz zemljišta, žuti iz sena is lame i zeleni iz stajskog đubriva) i odabranih *Bacillus* spp. sojeva iz NCBI baze, na osnovu aminokiselinske sekvence AiiA gena. Preuzeto i modificovano iz Rosić et al. (2025a).

Poravnate AiiA aminokiselinske sekvence su pretraživane na prisustvo razlika u konzervisanim aminokiselinama AiiA laktonaza, koji bi potencijalno mogli doprineti razlikama u QQ aktivnosti. Između sekvenci izolata uočen je visok stepen sličnosti, sa 79,63% istovetnih i 7,24% sličnih aminokiselina (Prilog 20). Međutim, kada su sekvence izolata poravnate sa sekvencama *Bacillus* spp. sojeva iz NCBI baze, procenat razlika u aminokiselinama je značajno porastao, dostižući 81,9% razlika u pojedinačnim aminokiselinama (Prilog 21). Istovetne aminokiseline izolata i NCBI sojeva su se najvećim delom nalazile u aktivnom mestu laktonaze.

Sve sekvence izolata pokazale su sličnost aminokiselinske sekvence aktivnog mesta sa konsenzusnom sekvencom (cd07729 MBL-fold lactonase) soja *B. thuringiensis* (Prilog 21). Među sekvencama nisu primećene razlike u aminokiselinama koje grade Zn^{2+} -vezujući domen.

Kako bi se ispitao uticaj specifičnosti za supstrat C_6 -HSL na primećenu razliku u QQ aktivnosti između YtnP laktonaze SS-38.4 soja i AiiA laktonaze SS-36.6/2 izolata, koji je pokazao najizraženiju QQ aktivnost, konstruisani su 3D modeli i simulirano je vezivanje supstrata (eng. *molecular docking*). Model AiiA laktonaze SS-36.6/2 izolata napravljen je na osnovu N-acil homoserin laktonaze AiiA modela, AlphaFold DB model of A0A2C1D257_BACCE (gen: A0A2C1D257_BACCE, organizam: *B. cereus*) (A0A2C1D257.1.A), kao matrice. Sličnost sekvence iznosila je 93,21%, sa Global Model Quality Estimate (GMQE) vrednosti od 0,98 (Slika 20A). Model YtnP laktonaze napravljen je na osnovu matrice metalo-beta-laktamaze modela: AlphaFold DB model of A0A6I7TWQ4_9BACI (gen: A0A6I7TWQ4_9BACI, organizam: *B. paralicheniformis*). Sličnost sekvence iznosila je 76,51%, a pouzdanost modela, izražena preko parametra GMQE, iznosila je 0,98 (Slika 20B). Oba modela predstavljaju homologne 3D modele proteina, bazirane na strukturnim šablonima dostupnim u Protein Data Bank (PDB) i deponovanim u SWISS-MODEL repozitorijumu pod navedenim imenima. Rezultati *molecular docking* analize su pokazali da SS-38.4 YtnP laktonaza ima gotovo pet puta niži afinitet prema C_6 -HSL (-1,6 kcal/mol) u poređenju sa SS-36.6/2 AiiA laktonazom (-5,9 kcal/mol), na osnovu negativne vrednosti slobodne energije. Modeli interakcije liganda sa aktivnim mestom enzima, gde su interakcije imale najviši rang po vrednosti najniže energije vezivanja, prikazani su na Slici 20. Kod oba modela, mesto vezivanja karakteriše kombinacija hidrofobnih (zelena) i hidrofilnih (crvena) regija, što odgovara amfifilnoj prirodi C_6 -HSL (Liu et al., 2017). Heksanoilni lanac primarno ostvaruje hidrofobne interakcije, dok se laktonski prsten uključuje u hidrofilne interakcije. Međutim, vezujuće mesto kod AiiA laktonaze pokazuje bolju komplementarnost (Slika 20), kao i veći broj interakcija i čvršće veze, uključujući vodonične (plave isprekidane linije), hidrofobne (sive isprekidane linije), jonske (žute isprekidane linije) i π - π interakcije (zelene isprekidane linije) u poređenju sa YtnP laktonazom.



Slika 20. 3D modeli YtnP i AiiA laktonaza, prikazani sa šemom boja koja ilustruje hidrofobnost aminokiselina [legenda: HL (hidrofilne), N (neutralne); HP (hidrofobne)], pokazuju poziciju C₆-HSL molekula u vezujućem mestu svake laktonaze. U vezujućem džepu aktivnog mesta (zapremine 2487 Å³) AiiA laktonaze, aminokiseline koje interaguju sa ligandima su: SER1, SER2, VAL3, ASN4, ASN11, LEU12, LEU13, ASN14, LEU15, PRO16, VAL17, MET35, PHE46, PHE50, VAL51, GLN54, ILE55, LEU56, PRO57, LYS58, HIS86, HIS88, PHE89, ASP90, HIS91, GLU118, HIS151, ASP173, TYR176, ALA188 i HIS217 (A). U vezujućem džepu (zapremine 190 Å³) YtnP laktonaze, aminokiseline koje interaguju sa ligandima su: THR67, GLY70, ARG71, GLY72, LYS73, SER88, ASN89, LEU90, LYS91, GLN92, ARG95, CYS101, CYS118, GLY119, THR121, GLU122, TYR123, VAL131 i PHE132 (B). Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025a).

4.4.4 PGP aktivnosti kao kompetitivne osobine SS-38.4 i P21 sojeva

Za proveru *in vitro* aktivnosti gena za PGP osobine detektovanih u genomima biokontrolnog soja SS-38.4 i patogenog soja P21, izabrane su osobine direktno vezane za kompeticiju za prostor i nutrijente i antagonističke interakcije (Tabela 6, Slika 21). Takođe, praćene su i osobine koje mogu doprineti pozitivnoj selekciji soja od strane biljke i tako osnažiti interakcije sa biokontrolnim sojem.

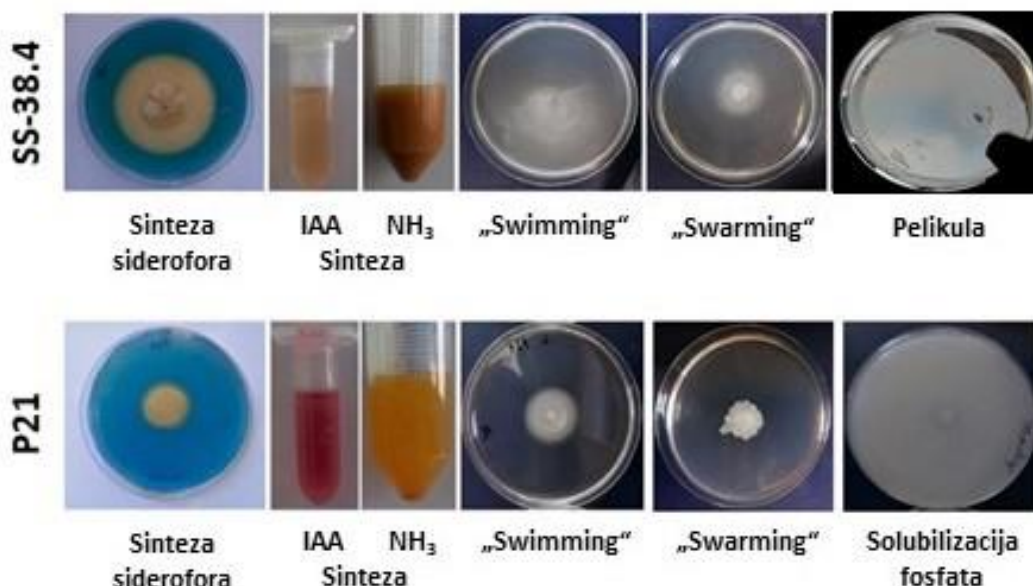
Produkcija siderofora, ispitana kroz aktivnost solubilizacije gvožđa, potvrđena je i kod biokontrolnog i kod patogenog soja. Međutim, biokontrolni soj je pokazao izraženiju aktivnost, kvantifikovanu kroz indeks produkcije siderofora, koji je iznosio 3,2 SPI, u odnosu na patogena (SPI 1,9). Soj P21 je, za razliku od SS-38.4, pokazao aktivnost u solubilizaciji fosfata. Oba soja su pokazala aktivnost u sintezi amonijaka, ali se SS-38.4 odlikovao izraženijom produkcijom. Solubilizacija cinka, mangana i kalijuma nije uočena ni kod SS-38.4 ni kod P21.

I biokontrolni i patogeni soj sintetisali su IAA, ali je sinteza bila izraženija kod biljnog patogena. Ni jedan soj nije produkovao HCN. U testu pokretljivosti tipa plivanja, uočeno je širenje SS.38.4 na celu površinu Petri šolje (54,45 cm²), dok je P21 zauzeo samo 3,65 cm². Soj SS-38.4 pokazao se aktivniji i u testu pokretljivosti tipa rojenja, gde je zauzeo površinu od 8,43 cm², a P21 5,59 cm².

Između sojeva su uočene i razlike u produkciji biofilma. Pokazano je da SS-38.4 produkuje biofilm tipa pelikule koji se javlja na površini medijuma pri stacionarnoj inkubaciji. Pod istim uslovima, P21 ne produkuje biofilm, već viskozna vlakna koja se lako spiraju sa površine podloge.

Tabela 6. PGP osobine i aktivnosti značajne za kolonizaciju biljke kod biokontrolnog soja SS-38.4 i biljnog patogena P21.

| Sojevi | Solubilizacija minerala | | | | | NH ₃ | IAA | HCN | Biofilm | Pokretljivost | |
|---------|-------------------------|---|----|----|----|-----------------|-----|-----|---------|---------------|------------|
| | P | K | Zn | Mn | Fe | | | | | „Swimming” | „Swarming” |
| SS-38.4 | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + |
| P21 | + | - | - | - | + | + | + | - | - | + | + |



Slika 21. Rezultati *in vitro* testova za PGP osobine značajne za kompetitivnu prednost biokontrolnog SS-38.4 soja i fitopatogena P21. Biokontrolni soj je pokazao izraženu sposobnost sinteze siderofora i amonijaka, intenzivnu pokretljivost, kao i sposobnost formiranja pelikule dok je kod P21 uočena slabija pokretljivost, smanjena produkcija siderofora i odsustvo biofilma. Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025b).

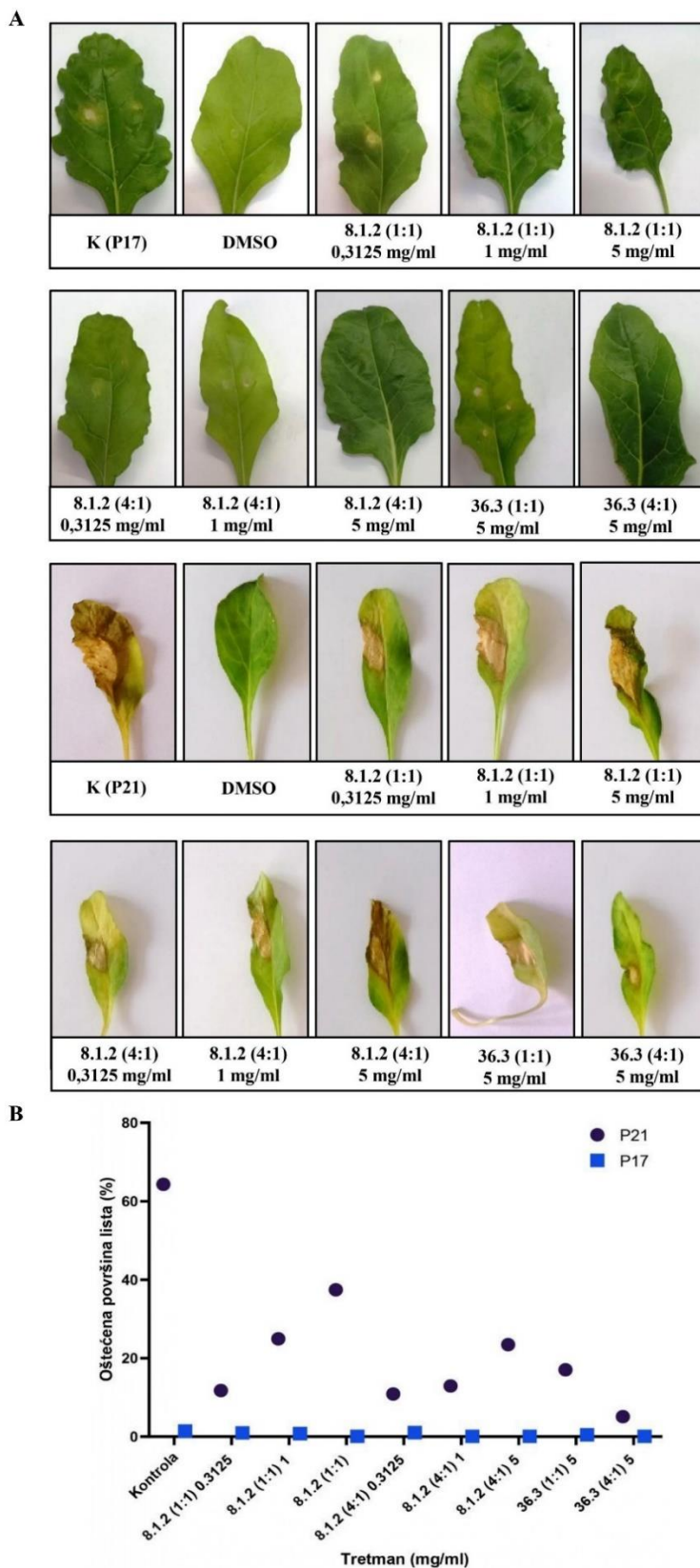
4.5 Rezultati biokontrolne aktivnosti i sposobnosti kolonizacije soja SS-38.4 in planta

4.5.1 Biokontrolna aktivnost etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida odabranih *Bacillus* spp. sojeva

Lipopetidni ekstrakti *B. pumilus* sojeva SS-8.1.2 i SS-36.3, koji su pokazali najbolju inhibitornu aktivnost protiv *P. syringe* pv. *aptata* P17 i P21, odabrani su za testiranje biokontrolnog efekta u filozferi šećerne repe.

Slabo virulentan soj P17, izazvao je očekivano slabe simptome koji su uočeni na samo 1,41% ukupne površine lista. Međutim, površina listova zahvaćena simptomima pokazivala je blag trend smanjenja sa porastom koncentracije ekstrakta oba *B. pumilus* soja (Slika 22A). Najslabije dejstvo ostvario je ekstrakt SS-8.1.2 u koncentraciji 0,31 mg/ml. Pri primeni ekstrakta SS-8.1.2 sa suspenzijom P17 u odnosu 1:1, površina pod simptomima iznosila je 0,99% lista, a 1% pri primeni u ekstrakta u četiri puta većoj zapremini. Najbolji efekat pokazao je ekstrakt SS-8.1.2 u koncentracijama 1 i 5 mg/ml i odnosu 4:1, kao i ekstrakt SS-36.3 u koncentraciji od 5 mg/ml i istom odnosu, smanjivši simptome na 0,1% površine (Slika 22).

Soj P21 je takođe izazvao očekivan intenzitet simptoma, koji su zahvatili više od polovine površine lista (64,3%). Svi primenjeni tretmani su značajno redukovali simptome lisne pegavosti. Tretman ekstraktom SS-36.3 u koncentraciji 5 mg/ml, primenjen u četiri puta većoj zapremini pokazao je najbolje rezultate (Slika 22A), smanjivši površinu zahvaćenu simptomima na 5,1%. Tretmani sa ekstraktom SS-8.1.2 najbolji efekat su pokazali u najnižoj koncentraciji (0,3125 mg/ml). Sa primenom u odnosu 1:1, simptomi su obuhvatali 11,7%, a u odnosu 4:1, 10,8% ukupne površine lista. Zanimljivo je istaći da trend redukcije simptoma sa povećanjem koncentracije i odnosa ekstrakta u odnosu na suspenziju, nije pokazivao očekivanu raspodelu, uočenu pri tretmanu ekstraktom SS-36.3. Primećen je porast zahvaćene površine listova sa 11,7% (0,3125 mg/ml), preko 24,9% (1 mg/ml) do 37,4% (5 mg/ml), pri odnosu 1:1. Ista pojava uočena je i pri odnosu 4:1, ali sa manjom zahvaćenom površinom listova (konc. 1 mg/ml 12,9% i 5 mg/ml 23,5%) (Slika 22).



Slika 22. Biokontrolni efekat etil-acetatnih ekstrakata lipopeptida sojeva *B. pumilus* SS-8.1.2 i SS-36.3, prikazan kroz intenzitet simptoma (A) i procenat zahvaćene površine lista (B) (foto I. Rosić)

4.5.2 Dinamika populacija SS-38.4 i P21 u filosferi i biokontrolni efekat suspenzije SS.38.4

4.5.2.1 Relativna i apsolutna metoda procene sposobnosti kolonizacije soja SS-38.4

Sposobnost SS-38.4 soja, izolovanog iz zemljišta, da uspešno kolonizuje filosferu šećerne repe, procenjena je primenom dve metode: tradicionalne mikrobiološke metode brojanja kolonija i molekularne metode ddPCR. Upoređene su srednje vrednosti broja vijabilnih ćelija SS-38.4, dobijene brojanjem kolonija, sa ukupnim brojem ćelija određenim na osnovu broja kopija soj specifične sekvence DNK SS-38.4, dobijenim ddPCR metodom (Prilog 28.1-28.4). Korelacija između dve metode, analizirana u kontrolnoj grupi i tretmanima T1 i T2, prikazana je na Slici 23A. Visoka vrednost Pirsonovog koeficijenta korelacije (r) označila je postojanje pozitivnog linearnog odnosa između relativne i apsolutne metode kvantifikacije SS-38.4. Koeficijenti korelacije u kontrolnoj grupi, kao i u tretmanima T1 i T2, bili su slični i iznosili redom: $r = 0,97$, $r = 0,98$ i $r = 0,95$ (Slika 23B, Prilog 29). Takođe, obe metode su pokazale identičnu dinamiku populacije SS-38.4 i u kontroli i tretmanima. Brojnost populacije pokazivala je stabilnost tokom perioda od sedam dana, dok je 14. dana došlo do pada (Tabela 7).

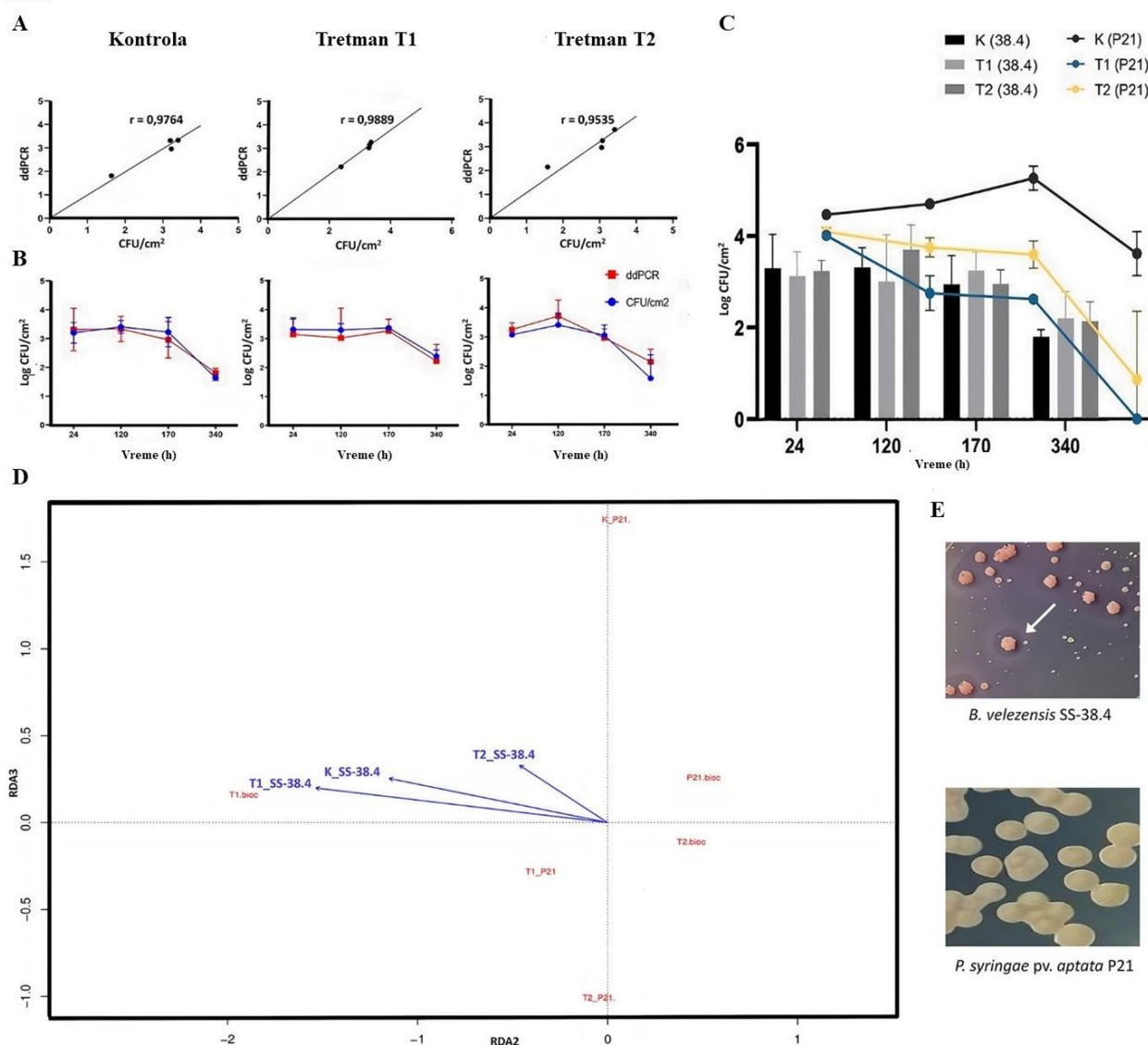
4.5.2.2 Dinamika populacija SS-38.4 i P21

Nakon prvog merenja, u kontrolnim grupama biljaka, tretiranim samo suspenzijom SS-38.4 ili P21, primećena je razlika u brojnosti biokontrolnog soja i biljnog patogena, koja se održavala tokom celokupnog trajanja eksperimenta (Prilog 30.1-30.4). Na samom početku praćenja dinamike populacija u kontrolnoj grupi (24. sata i petog dana), populacija P21 bila je brojnija od SS-38.4. Ova razlika u brojnosti P21 se povećavala do sedmog dana, nakon čega je primećen pad brojnosti poslednjeg, 14. dana. Brojnost SS-38.4 održavala se na niskoj vrednosti od oko $3,27 \log_{10} \text{CFU/cm}^2$, sve do značajnog pada brojnosti na kraju eksperimenta (Slika 23).

Nakon 24 h, nisu primećene značajne razlike u brojnosti biokontrolnog soja i biljnog patogena u tretmanima T1 i T2 (Prilog 31). Međutim, od petog dana je primećeno smanjenje brojnosti P21 u T1, i to 1,75 puta u odnosu na brojnost u kontrolnoj grupi. Tokom tog perioda, populacija SS-38.4 je održavala stabilnu brojnost u oba tretmana, približno kontrolnoj grupi. Sedmog dana je u tretmanu T2 takođe primećen pad brojnosti P21, koji je opisan petog dana u tretmanu T1. Tokom narednih dana, populacija P21 u tretmanu T1 je nastavila da opada, sve do 14. dana kada je primećen potpuni izostanak rasta P21 (Slika 23C, Prilog 31).

Tabela 7. Srednje vrednosti brojnosti populacija SS-38.4 i P21 u filosferi. Brojnost SS-38.4 određena je tradicionalnom mikrobiološkom metodom (CFU/cm^2) i molekularnom metodom (ddPCR). Brojnost je izražena u logaritamskoj skali.

| Tretman | 24 h | | 5. dan | | 7. dan | | 14. dan | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | Kolonije | ddPCR | Kolonije | ddPCR | Kolonije | ddPCR | Kolonije | ddPCR |
| K(38.4.1) | 3,199227 | 3,310885 | 3,402804 | 3,327713 | 3,223783 | 2,955792 | 1,640872 | 1,813119 |
| K(P21) | 4,462752 | / | 4,698651 | / | 5,259308 | / | 3,611094 | / |
| T1 (38.4) | 3,313481 | 3,144205 | 3,294894 | 3,021549 | 3,368142 | 3,264851 | 2,38478 | 2,219305 |
| T1 (P21) | 4,009803 | / | 2,749777 | / | 2,619701 | / | 0 | / |
| T2 (38.4) | 3,076868 | 3,253082 | 3,409885 | 3,715003 | 3,05524 | 2,96605 | 1,583195 | 2,151357 |
| T2 (P21) | 4,088167 | / | 3,746213 | / | 3,591142 | / | 2,960782 | / |



Slika 23. Dinamika brojnosti populacija SS-38.4 i P21 i njihov efekat na filosferu šećerne repe (Kontrola-K38.4 i KP21; tretman pre infekcije T1 i tretman nakon infekcije T2). Pirsonov koeficijent korelacije između vrednosti brojnosti populacije SS-38.4 dobijenih tradicionalnom mikrobiološkom i molekularnom metodom (A). Dinamika populacije SS-38.4 procenjena na osnovu tradicionalne mikrobiološke i molekularne metode (B). Dinamika populacije SS-38.4 (stubići) i P21 (linije) u kontroli i tretmanima tokom perioda od 14 dana, prikazana u satima (C). RDA triplot sa plavim sterlicama koje označavaju brojnost SS-38.4 u kontroli i tretmanima i crvenim tačkama koje odgovaraju biokontrolnom efektu svakog tretmana i brojnosti P21 (D). Morfologija kolonija SS-38.4 i P21, čiji je broj određivan nakon rasta na odgovarajućim podlogama (E). Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025b).

4.5.2.3 Biokontrolna aktivnost SS-38.4

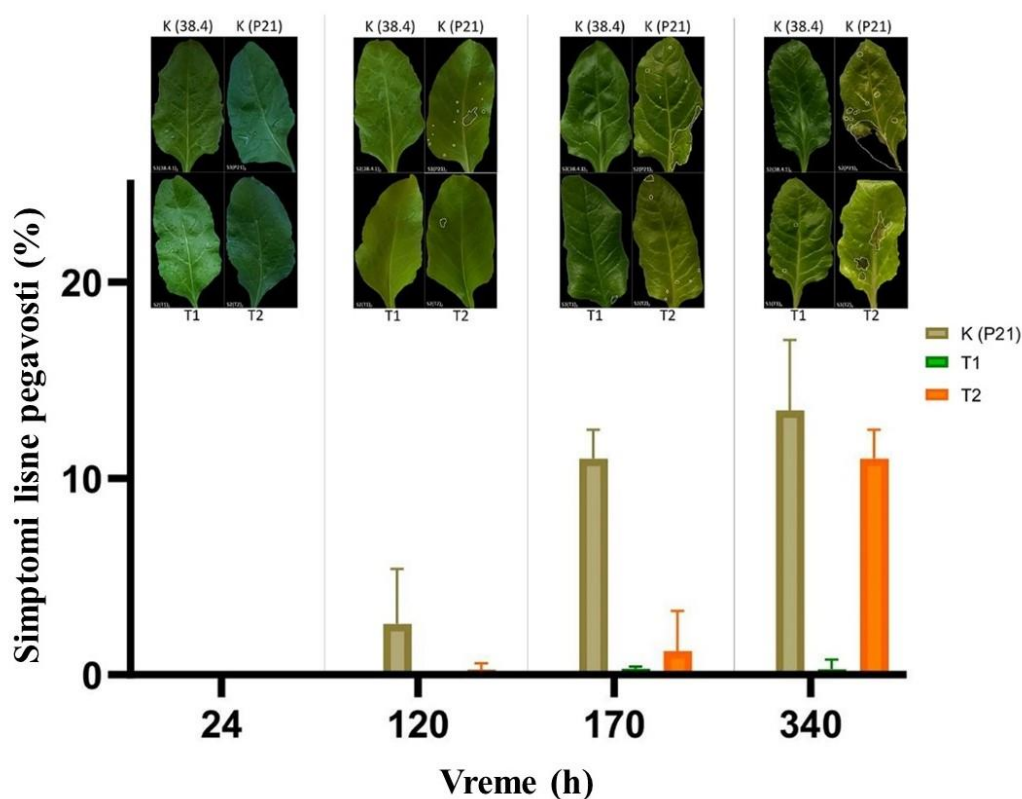
Simptomi lisne pegavosti nisu primećeni ni u kontrolnoj grupi P21, ni u tretmanima T1 i T2 nakon 24 h. Od petog dana, uočeni su blagi simptomi koji su u kontrolnoj grupi obuhvatali u proseku 2,6% ukupne površine listova, a u tretmanu T2 0,26%. Listovi biljaka u tretmanu T1 nisu pokazivali simptome. Međutim, razlike između kontrolne grupe i tretmana nisu bile statistički značajne.

Sedmog dana, simptomi u kontrolnoj grupi su se proširili, zahvatajući u proseku 11% površine listova. U tretmanu T1, takođe je uočena pojava simptoma, koji su zahvatali 0,32% površine lista. Povećanje intenziteta simptoma je primećeno i u tretmanu T2 (1,21% površine lista).

Površina listova sa simptomima kod biljaka tretiranih samo biljnim patogenom, bila je značajno veća u odnosu na biljke iz obe grupe tretmana, kao i kontrolu tretiranu samo biokontrolnim sojem (Slika 24, Prilog 32.1-32.4, Prilog 33).

Poslednjeg dana, simptomi u kontrolnoj grupi P21 obuhvatali su u proseku 13,45% površine, u tretmanu T1 0,85%, a u tretmanu T2 11%. Kako su simptomi u T1 tretmanu bili minimalni, ovaj tretman je pokazao sličan efekat kao i kontrola tretirana samo biokontrolnim sojem SS-38.4, kod koje simptomi nisu bili prisutni. Nasuprot tome, u T2 tretmanu, uočeni su simptomi infekcije. Zbog toga se T1 tretman može smatrati efikasnijim u supresiji simptoma oboljenja (Slika 24, Prilog 32.1-32.4, Prilog 33).

Sa padom brojnosti populacije patogena P21, primećeno je i smanjenje površine lista pod simptomima. Rezultati analize redundancije potvrdili su da je primena soja SS-38.4 dovela do smanjenja brojnosti P21, što ukazuje na izražen biokontrolni efekat SS-38.4. Korelacija između brojnosti SS-38.4 (CFU/cm²) u kontroli i u oba tretmana, potvrđuje stabilnost populacije ovog soja u filosferi (položaj sterlica na Slici 23D). Položaj strelica na RDA grafiku koje predstavljaju vrednost broja populacije SS-38.4 obrazuju karakterističan oštar ugao, među kojima najduža odgovara tretmanu T1. Takođe, položaj tačke koja odgovara brojnosti P21, pokazuje negativnu korelaciju sa brojem SS-38.4 u T1. Ovakav raspored i odnos elemenata RDA grafika, ističe uticaj tretmana T1 kao najznačajnijeg u smanjenju brojnosti P21 i simptoma lisne pegavosti.



Slika 24. Efekat primene SS-38.4 na suzbijanje simptoma lisne pegavosti šećerne repe u tretmanima pre i nakon inokulacije patogena u intervalima od 24 h, pet (120 h), sedam (170 h) i 14 dana (340 h). Površina zahvaćena simptomima obeležena je belim linijama. K (38.4) predstavlja negativnu kontrolu, a K (P21) pozitivnu kontrolu bolesti. Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025b).

4.6 Analiza genoma *B. velezensis* SS-38.4

4.6.1 Opšte karakteristike genoma

Primenom PacBio tehnologije sekvenciranja, dobijeno je ukupno 15379 sirovih sekvenci, opsega veličina od 100 do 19499 baznih parova. Nakon asembliranja dobijen je draft genom od dva kontinga, ukupne veličine 4007389 bp i procentom GC baznih parova 56,7% (Slika 25A, Prilog 34). Dubina sekvenciranja bila je 21,78×, sa 99,99% pokrivenošću. U genomu nisu detektovane plazmidne sekvence.

RAST anotacijom genoma identifikovano je 4219 gena, sa 95,75% protein-kodirajućih gena, a primenom PGAP anotacije 3965 gena, od kojih 94,95% protein-kodirajućih. 2,98% genoma, na osnovu RAST anotacije i 3,3% prema PGAP, predstavljali su gene za RNK. Među njima, na osnovu RAST anotacije identifikovano je 95 gena za tRNK i 31 za rRNK, a PGAP anotacijom 96 gena za tRNK, 31 za rRNK i 5 ncRNA gena. Takođe, PGAP anotacijom otkriveno je 68 pseudogena. RAST anotacijom 1542 protein-kodirajuća gena klasifikovana su u 323 podsistema na osnovu funkcije. Najveći broj gena uključen je u sintezu aminokiselina i njihovih derivata (6,9%), u metabolizam proteina (5,37%) i metabolizam ugljenih hidrata (5,29%) (Prilog 35).

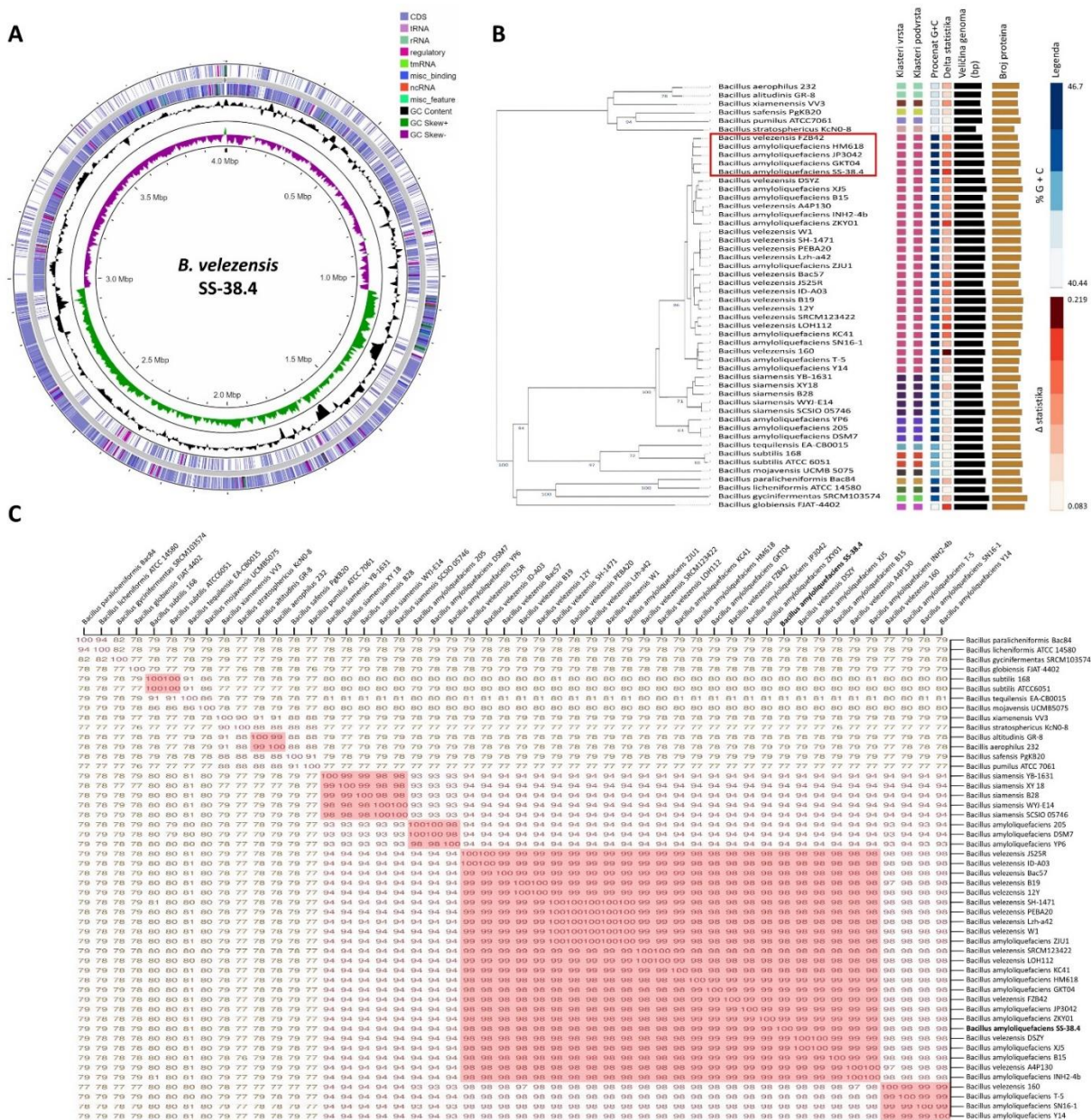
4.6.2 Taksonomija i filogenija

Bacillus spp. sojevi za komparativnu analizu i precizno određivanje taksonomskog i filogenetskog položaja SS-38.4 soja, izabrani su na osnovu njegove prethodne identifikacije (Dimkić et al., 2015). Izabrano je 50 predstavnika *B. subtilis* kompleksa vrsta (Prilog 36), među kojima su najbrojniji bili predstavnici "Operativne grupe *B. amyloliquefaciens*" (16 *B. amyloliquefaciens*, 15 *B. velezensis* i pet *B. siamensis*).

Prva filogenetska analiza u TYGS programu obuhvatila je, pored odabranih predstavnika *B. subtilis* kompleksa vrsta, još 50 dodatnih *Bacillus* spp. genoma, sa najvećim poklapanjem sa genomima odabranih predstavnika. U okviru filogenetskog stabla, na osnovu dDDH hibridizacije, sojevi su raspoređeni u 33 specijske grupe i 35 subspecijskih grupa. SS-38.4 je u ovoj analizi bio raspoređen u grupu sastavljenu od 13 *B. amyloliquefaciens* sojeva, svih 15 *B. velezensis* sojeva, i jednog *B. methylotrophicus* soja iz TYGS baze (Prilog 37). Slični rezultati dobijeni su i u narednoj analizi koja nije obuhvatala genome iz TYGS baze, već samo 50 odabranih genoma, čime je potvrđena robusnost grupisanja (Slika 25B).

Korišćenjem podataka iz TYGS baze, svih 50 odabranih sojeva je dodatno taksonomski identifikovano. Rezultati su pokazali da 16 *B. amyloliquefaciens* sojeva (uključujući i SS-38.4) iz prethodno navedenog klastera pripada vrsti *B. velezensis*. Značajno je istaći da je vrednost dDDH hibridizacije genoma SS-38.4 i genoma *B. velezensis* sojeva bila između 80-90%. Ostali *B. amyloliquefaciens* sojevi, koji su u TYGS analizi identifikovani kao *B. velezensis*, takođe su pokazali 80-90% vrednosti dDDH hibridizacije sa *B. velezensis* genomima, dok je njihova sličnost sa "pravim" *B. amyloliquefaciens* genomima iznosila u proseku samo 56%. Soj SS-38.4 je u obe analize zauzimao jasan položaj u izdvojenoj grupi na filogenetskom stablu, zajedno sa još četiri soja: *B. amyloliquefaciens* GKT04, *B. amyloliquefaciens* JP3042, *B. amyloliquefaciens* HM618, i *B. velezensis* FZB42 (Slika 25B). Među njima, najveća sličnost je uočena između SS-38.4 i GKT04 soja. Sojevi GKT04, JP3042 i HM618 su takođe identifikovani kao *B. velezensis*.

Rezultati grupisanja sojeva na osnovu ANI vrednosti potvrdili su jasno grupisanje SS-38.4 sa GKT04, JP3042, HM618 i FZB42 (Prilog 38). Takođe, za sve *B. amyloliquefaciens* sojeve identifikovane kao *B. velezensis* u TYGS bazi, vrednosti ANI su bile između 98-99%, uključujući i SS-38.4. ANI vrednosti genoma svih sojeva prvobitno identifikovanih kao *B. velezensis* su takođe iznosile 98-99%, dok su za prvobitno identifikovane *B. amyloliquefaciens* sojeve (čija identifikacija nije promenjena nakon TYGS analize) bile 94% (Slika 25C).



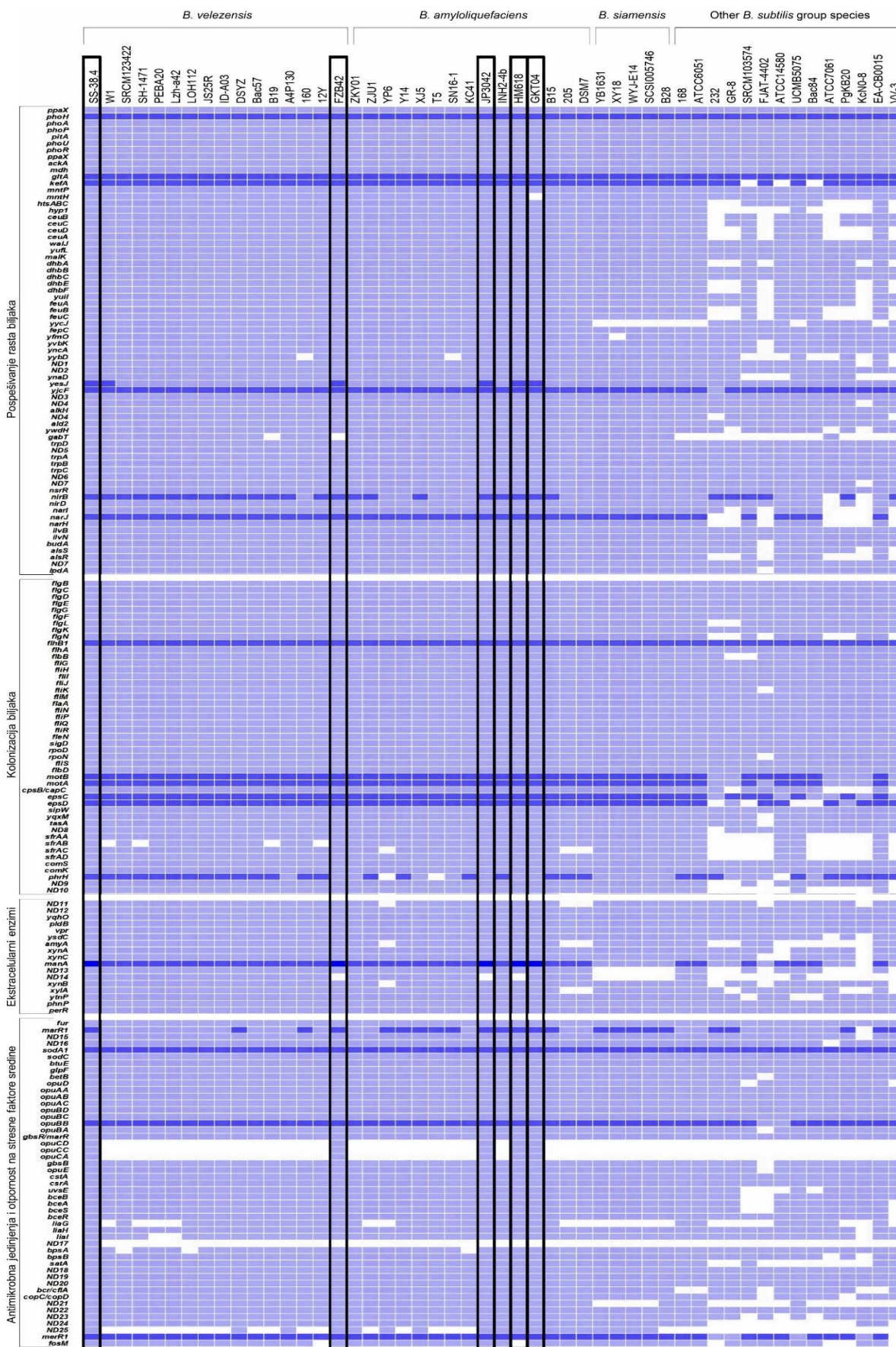
Slika 25. Prikaz cirkularnog genoma SS-38.4, sa obeležjenim položajima kodirajućih sekvenci (CDS), transportnih RNK (tRNK), ribozomalnih RNK (rRNK), transport-informacionih RNK (tmRNK), nekodirajućih RNK (ncRNK) i GC sadržajem (A). Filogenetsko stablo 50 genoma sojeva iz *B. subtilis* kompleksa vrsta, konstruisano primenom “Genome BLAST Distance Phylogeny” (GBDP) pristupa, na osnovu vrednosti dDDH, zajedno sa upoređenim informacijama o genomima (GC procenat, delta statistika, veličina genoma i broj protein-kodirajućih gena). Roze kvadratići označavaju klaster od 13 *B. amyloliquefaciens* sojeva, sada identifikovanih kao *B. velezensis*. Crveno uokvireni sojevi predstavljaju grupu sojeva najbližnjih SS-38.4: *B. amyloliquefaciens* GKT04, HM618 i JP3042 i *B. velezensis* FZB42 (B). ANI matriks 50 genoma sojeva iz *B. subtilis* kompleksa vrsta. Položaj SS-38.4 obeležen je boldom. Vrednosti ANI potvrđuju rezultate dobijene DDH grupisanjem, sa najvećim procentom sličnosti (98-99%) između sojeva uokvirenih crevno na filogenetskom stablu, sada identifikovanih kao *B. velezensis*. Sve ANI vrednosti iznad 98% obeležene su roze bojom (C). Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025b).

4.6.3 Analiza pangenoma

Genetički diverzitet, funkcionalni repertoar gena i odnos SS-38.4 i ostala četiri *B. velezensis* soja (GKT04, JP3042, HM618 i FZB 42) dublje su istraženi kroz komparativnu genetičku analizu, sa FZB42 kao referentnim sojem. Pangenomska analiza obuhvatala je 4339 gena. Pokazano je da je najveći broj tih gena (78.1%) konzervisan, čime je potvrđena visoka sličnost između navedenih sojeva (Prilog 39). Njihovoj varijabilnosti doprinelo je 10,41% neesencijalnih ili “shell” gena. Mali broj jedinstvenih, “singleton” gena, takođe je potvrdio genetičku sličnost sojeva. Genom SS-38.4 bio je drugi po broju jedinstvenih gena (ukupno 97), dok je najviše jedinstvenih gena posedovao HM618 (ukupno 101). Polovina ovih gena nije okarakterisana i klasifikovana je u hipotetičke.

Funkcionalnom anotacijom pangenoma, esencijalni (“core”), neesencijalni (“shell”) i jedinstveni (“singleton”) geni su klasifikovani u 5,642 KEGG i 4,773 COG funkcionalnih kategorija. Najveći broj gena pripadao je COG kategoriji metabolizma i transporta aminokiselina i KEGG kategoriji proteinskih familija asociranih sa ćelijskim procesima (Prilog 40).

Komparativna genetička analiza gena asociranih sa promocijom rasta biljaka, kolonizacijom biljaka, sintezom ekstracelularnih enzima, produkcijom antimikrobnih sekundarnih metabolita i otpornošću na negativne faktore sredine, takođe je potvrdila visoku sličnost između genoma pet sojeva. Značajna razlika primećena je samo u prisustvu hipotetičkog proteina (ND 17), sličnog amilociklicinu iz familije bakteriocina (Slika 26).



Slika 26. Uporedni prikaz gena asociраних са поспешивањем раста биљака, колонизацијом биљака, продукцијом екстрацелуларних ензима, антимикробних јединjenja и отпорношћу на негативне факторе средине у геномима одабраних сојева из Оперативне групе *B. amyloliquefaciens* (*B. velezensis*, *B.*

amyloliquefaciens i *B. siamensis*) i ostalih genoma sojeva iz *B. subtilis* kompleksa vrsta. Geni obeleženi sa ND (*Not Defined*) su geni sa poznatom funkcijom, ali bez dodeljenog imena. Kolone gena uokvirene crno predstavljaju genski repertoar četiri soja najbližnja sa SS-38.4. Tamno plavo su obeleženi duplirani geni. Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025b).

4.6.3.1 Geni asocirani sa PGP osobinama u genomima SS-38.4 i P21

PGP osobine su u ovom radu posmatrane u svetlu kompetitivnog potencijala biokontrolnog soja SS-38.4 i biljnog patogena P21. Pretraživani su geni direktno vezani za kompeticiju za prostor i nutrijente, kao i produkciju ekstracelularnih enzima i antimikrobnih jedinjenja (Prilog 41). Takođe, istraženi su i geni značajni u interakcijama biokontrolnog soja i biljke - geni čiji su produkti sa ulogama u solubilizaciji minerala i produkciji biljnih hormona. Aktivnost svih detektovanih gena potvrđena je prethodno opisanim *in vitro* testovima.

Geni asocirani sa sintezom siderofora, odnosno solubilizacijom gvožđa i sintezom amonijaka potvrđeni su i u genomu SS-38.4 i P21 (Slika 27, Prilog 41). U genomu SS-38.4 identifikovani su geni za sintezu siderofora kateholskog tipa - bacilibaktin, dok su u genomu P21 identifikovani geni za siderofore iz hidrosil/karboksilatne klase - ahromobaktin.

Geni *nirBD* i *nor* (Hamada and Soliman, 2023), ključni u sintezi amonijaka, bili su prisutni u genomima oba soja.

4.6.3.2 Geni asocirani sa kolonizacijom biljaka

Među RAST podsistemima nakon anotacija SS-38.4 genoma, nije izdvojen podsistem gena sa ulogama u QS i formiranju biofilma. Međutim, detektovani su specifični geni, uključeni u navedene procese, kao na primer *tasA* i geni sa ulogama u sintezi egzopolisaharida (Slika 27, Prilog 41). Nakon analize P21 genoma, takođe nisu izdvojeni posebni RAST podsistemi sa navedenim funkcijama gena. U P21 genomu detektovani su geni za komponente matriksa biofilma: *psl* geni koji kodiraju polisaharide biofilma i geni za sintezu alginata i enzima levansaharaze koji (Slika 27, Prilog 42), koji je odgovoran za sintezu levana iz saharoze.

Geni asocirani sa sintezom surfaktina, *urf* geni, detektovani su u genomu SS-38.4 (Prilog 41).

4.6.3.3. Geni asocirani sa sintezom ekstracelularnih enzima

U genomu SS-38.4 otkriveni su geni koji kodiraju enzime celulazu, ksilanazu, manazu i amilazu (Prilog 41).

Genom P21 nije sadržao gene uključene u QS aktivnost.

4.6.3.4 Geni SS-38.4 soja asocirani sa sintezom sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću

Genom je pretraživan na prisustvo gena za ribozomalno i neribozomalno sintetisane peptide. Softver BAGEL je identifikovao prisustvo bakteriocina amilociklicina (Prilog 42A), a AntiSMASH analiza je detektovala 11 klastera za sintezu sekundarnih antimikrobnih jedinjenja (Prilog 42B). Pet klastera pokazalo je 100% sličnost sa istim, dobro okarakterisanim klasterima prisutnim u genomu *B. velezensis* FZB42. Poređenjem sa MIBiG bazom klasteri su identifikovani kao sintetski klasteri za bacilizin, makrolaktin H, bacilen, fengicine i dificidin. Sledeći klaster pokazao je 100% sličnost sa bacilibaktinskim sintetičkim klasterom *B. amyloliquefaciens* 168. Dva klastera nisu pokazala sličnost ni sa jednim poznatim klasterom u bazi. Jedan je identifikovan kao terpenički klaster sa skvalenskim ili fitoenskim jedinjenjem kao krajnjim produktom, dok za drugi klaster u vezi sa sintezom poliektida krajnji produkt biosinteze nije bio poznat. Ostala dva klastera označena su kao

butirozinski klaster sa 7% sličnosti sa klasterom *B. cicrulans* i locilomicinski klaster sa 21% sličnosti sa *B. subtilis* klasterom (Prilog 27B).

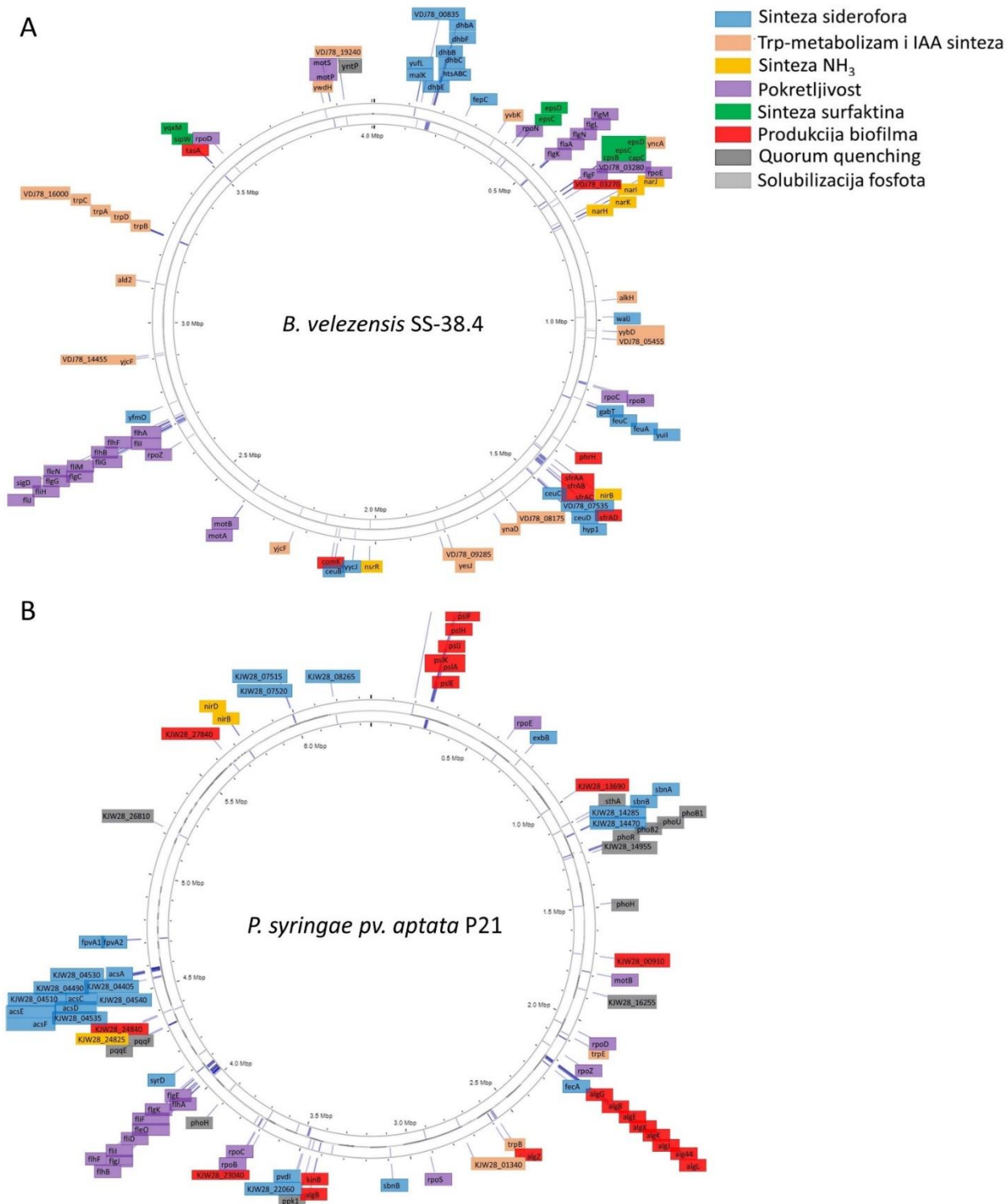
4.6.3.5 Geni SS-38.4 asocirani sa adaptacijama na negativne faktore sredine

Od gena koji omogućavaju opstanak populacije SS-38.4 u filosferi, identifikovane su četiri grupe gena. Među genima čiji produkti pružaju zaštitu od oksidativnog stresa identifikovano je 10 gena, od kojih se mogu izdvojiti superoksid dismutaza i glutation peroksidaza. Najveći broj gena (17) ima funkciju u zaštiti od osmotskog stresa. Adaptacija na nedostatak hranljivih materija u filosferi najverovatnije je omogućena prisustvom gena koji su aktivni u gladovanju - "stringent response". Otpornost na UV zračenje potencijalno je obezbeđena genom za endonukleazu koja ispravlja UV - indukovana oštećenja DNK (Prilog 41).

4.6.3.6 Geni SS-38.4 asocirani sa virulencijom i rezistentnošću na negativne hemijske faktore

Provera prisustva gena koji kodiraju za virulentne faktore, kao i gena odgovornih za rezistentnost na najčešće primenjivane antibiotike, neophodna je zarad provere bezbednosti primene biokontrolnog soja. IslandViewer program identifikovao je tri genomska ostrva koja su sadržala profagne i hipotetičke gene, ali ne i gene za faktore virulencije ili druge gene zbog kojih bi SS-38.4 bio označen kao potencijalni patogen. Takođe, u genomu nisu identifikovani geni za toksine i superantigene.

Od gena za rezistentnost u genomu su pronađeni samo geni koji kodiraju za otpornost na prisustvo teških metala (kobalt, cink, kadmijum, olovo i živu). SS-38.4 je potencijalno rezistentan na fosfomicin i streptotricin, zbog detektovanih gena *fosB* (*fosfomicin resistance protein*) i streptotricin acetiltransferaze (Prilog 40, Prilog 44).



Slika 27. Repertoar gena sojeva SS-38.4 (A) i P21 (B) koji kodiraju za osobine značajne u pospešivanju rasta i kolonizaciji biljaka. Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025b).

5. DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Prelazak sa *in vitro* istraživanja, u kojima veliki broj *Bacillus* spp. sojeva pokazuje izražen potencijal za uspešnu primenu u biokontrolnim i biostimulatornim formulacijama, na kontrolisane *in planta* i poljske uslove, predstavlja jedan od najvećih izazova „zelene poljoprivrede“ (Besset-Manzoni et al., 2019). Glavni preduslov za ostvarivanje dejstva biokontrolnih i PGP *Bacillus* spp. sojeva je kolonizacija biljnih tkiva i organa na koje su primenjeni (Compant et al., 2019; Romano et al., 2020). Međutim, složena isprepletanost različitih biotičkih i abiotičkih faktora, od kompatibilnosti sa biljkom i njenom mikrobiotom, preko rezistentnosti biljnih patogena, pa sve do klimatskih i mikroklimatskih uslova, čini kompleksno okruženje koje u velikoj meri određuje uspešnost *Bacillus* spp. sojeva i formulacija (Ramírez-Pool et al., 2024). To je posebno izraženo u filiosferi, gde je i uticaj abiotičkih stresora dosta izraženiji nego u rizosferi (Legein et al., 2020). Iako se kao potencijalno rešenje nameće upotreba izolovanih aktivnih metabolita *Bacillus* spp. sojeva, perspektivnije izgleda za ostvarivanje boljih rezultata u očuvanju zdravlja i prinosa biljaka imaju formulacije na bazi ćelija (Patani, et al., 2024; Vasques et al., 2024). Primenjene ćelije biokontrolnih/PGP sojeva samostalno regulišu sintezu i oslobađanje aktivnih supstanci (hormona, isparljivih i antimikrobnih jedinjenja) u zavisnosti od abiotičkog i biotičkog konteksta životne sredine, čime sprečavaju rast populacije patogena bez njegove potpune eliminacije. Dodatno, mehanizmi biokontrole i pospešivanja rasta većinom deluju sinergistički, pružajući biljci istovremeno zaštitu od različitih patogena i stimulaciju rasta, za razliku od samostalno primenjenih lipopeptida sa ograničenim spektrom aktivnosti čija efikasnost zahteva primenu visokih koncentracija. Takođe, izolacija i prečišćavanje određenih metabolita (enzima, lipopeptida, siderofora, VOCs) u većim količinama i održavanje njihove stabilnosti u preparatima je zahtevan i retko isplativ proces (Meng et al., 2015). *Bacillus* spp. sojevi su, nasuprot njima, pokazali otpornost i stabilnost u formulacijama usled prirodne sposobnosti formiranja endospora, pa je i proizvodnja preparata jednostavnija i ekonomična (Yáñez-Mendizabal et al., 2012). Stoga je ulaganje u istraživanja ka razumevanju biokontrolnih i PGP osobina *Bacillus* spp. sojeva, uz razvoj metoda za praćenje vremenske i prostorne dinamike populacije *in planta*, neophodno za uspeh formulacija na bazi *Bacillus* spp. sojeva (Zhang et al., 2023).

U tom kontekstu, razvoj pouzdanih soj-specifičnih metoda za praćenje bakterijskih biokontrolnih agenasa ima višestruki značaj. Pre svega, takve metode omogućavaju detekciju i kvantifikaciju biokontrolnog agensa nakon primene direktno na biljno tkivo, čime se prati dinamika njegove populacije tokom vremena. To je ključno za razumevanje da li i kada biokontrolni agens dostiže brojnost dovoljnu za ostvarivanje željenog biokontrolnog efekta. Pored toga, soj-specifična detekcija i praćenje pružaju uvid u potencijalne potrebe za optimizacijom tehnološke proizvodnje biokontrolnog preparata i načina njegove primene, jer brojnost i stabilnost soja mogu značajno varirati u zavisnosti od formulacije preparata (Daranas et al., 2024). Praćenje dinamike populacije omogućava i ispitivanje uticaja različitih abiotičkih i biotičkih faktora, uključujući klimu, uticaj biljne vrste na koju je primenjen biokontrolni soj i prisustvo patogena, koji i predstavljaju glavne ograničavajuće faktore za efikasnost biokontrolnih sojeva u polju. Takođe, praćenje populacije biokontrolnog soja u polju ključno je i za procenu njegove ekološke sudbine: vremena opstanka stabilne populacije na biljci nakon primene, uspešnosti kolonizacije biljnog tkiva, genetičke stabilnosti, kao i njegovog potencijalnog uticaja na neciljne organizme, uključujući korisne insekte, okolne biljke i mikrobiotu biljke domaćina (Ayaz et al., 2023). Praćenje dinamike populacije omogućava i identifikaciju kritičnih tačaka za uspešnu aktivnost biokontrolnog agensa, kada je primena najefikasnija. Tako je u ovom radu pokazano da soj SS-38.4 ostvaruje najbolji efekat kada se primeni pre inokulacije patogena, čime se omogućava rano zauzimanje niše, što je potvrđeno i eksperimentalno i kroz detekciju gena značajnih za proces kolonizacije. Na kraju, razumevanje efikasnosti i ponašanja biokontrolnog agensa u različitim uslovima kroz praćenje dinamike njegove populacije, predstavlja i neophodan korak u procesu registracije biokontrolnih preparata.

Istraživanja u ovom radu temelje se na prethodno formiranoj kolekciji *Bacillus* spp. izolata poreklom iz zemljišta, sena, slame i stajskog đubriva (Berić et al., 2009; Stanković et al., 2012).

Veliki broj predstavnika kolekcije pokazao je izražen biokontrolni potencijal u *in vitro* istraživanjima, koja su bila usredsređena na aktivnost lipopeptidnih ekstrakta sojeva *B. velezensis* SS-38.4, *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i *B. pumilus* SS-8.1.2. Ekstrakti ovih izolata posebno su se istakli u inhibiciji biljnog patogena *P. syringae* pv. *aptata* (Dimkić et al., 2013; Dimkić et al., 2015; Dimkić et al., 2017; Nikolić et al., 2019; Marković et al., 2023). Iako u Srbiji u poslednjih desetak godina nisu prijavljene epidemije *P. syringae* pv. *aptata*, koja bi po razmerama bila uporediva sa epidemijom iz 2013. godine, dosadašnja istraživanja ističu sposobnost širenja ovog patogena povezanu sa ciklusom kruženja vode u prirodi i njegovu izuzetnu sposobnost preživljavanja u atmosferi i vodi (Monteil et al., 2014; de Araujo et al., 2019; Donati et al., 2020; Anteljević et al., 2023). Na taj način lako može doći do širenja epidemije putem padavina i nekontrolisanjem kvaliteta vode koja se koristi u irigacionim sistemima. Takođe, poslednjih godina, u SAD, koje su na prvom mestu po proizvodnji šećerne repe, prisustvo *P. syringae* pv. *aptata* je otkriveno u komercijalnim usevima šećerne repe i srodnih kultura (Joanna et al., 2018; Rotondo et al., 2019; Nampijja et al., 2021). Stoga identifikacija, proučavanje i priprema formulacija na bazi *Bacillus* spp. sojeva, kao *B. velezensis* SS-38.4, sa sposobnošću kontrole izrazito virulentnog soja *P. syringae* pv. *aptata* P21, predstavlja značajan doprinos održavanju zdravlja i prinosa ove važne industrijske biljke. Upravo glavni rezultat ovog rada predstavlja otkrivanje izuzetnog potencijala zemljišnog izolata *B. velezensis* SS-38.4 kao preventivnog preparata za biološku kontrolu *P. syringae* pv. *aptata* P21 u filozofiji šećerne repe. Optimizacija SCAR_{38.4}-ddPCR metode omogućila je precizno praćenje preživljavanja, kolonizacije i populacione dinamike SS-38.4 tokom vremena. Takođe, primenom metoda genomike i *in vitro* testova određeni su mogući biokontrolni mehanizmi odgovorni za uspešnost SS-38.4 u filozofiji, kao i PGP osobine, koje pored uloge u biokontroli mogu doprineti pospešivanju rasta i prinosa biljaka.

Kako je sekvenciranje celokupnih genoma za pozamašne kolekcije *Bacillus* spp. izolata i dalje informatički i finansijski zahtevno, RAPD i rep genetičko profilisanje predstavlja pouzdanu, brzu i jednostavnu metodu za procenu genetičke sličnosti i polimorfizama između velikog broja *Bacillus* spp. izolata (Ambreetha et al., 2023). U osnovi rep-PCR metode je umnožavanje regiona intergenske DNK između mesta vezivanja prajmera, repetitivnih elemenata genoma (GTG ponovci, tri BOX regiona ili repetitivne konsenzusne sekvence enterobakterija) (Ruiz Rodríguez, et al., 2019; Macůrková et al., 2021), dok RAPD-PCR omogućava generisanje amplikona nasumičnim vezivanjem oligonukleotidnih prajmera u genomu (Williams et al., 1990). Obe metode su prilično istaknute i korišćene za diferencijaciju između *Bacillus* spp. izolata. Prednost RAPD metode je mogućnost korišćenja bez ikakvog prethodnog znanja o izolatima. Međutim, upravo vezivanje prajmera za nasumične sekvence genoma može biti i nedostatak, usled slabe reproducibilnosti metode (Baldy-Chudzik et al., 2001). Rep-PCR u tom pogledu ima prednost, usled veće specifičnosti vezivanja prajmera, ali je neophodno da izolat poseduje odgovarajuće repetitivne elemente (Versalovic et al., 1998). Obe metode mogu se primenjivati u odabiru regiona za dizajn soj-specifičnih prajmera, na osnovu umnoženih jedinstvenih sekvenci genoma (ReddyPriya et al., 2019; Hernández et al., 2020). Konverzija jedinstvenih rep ili RAPD amplikona u jedinstvene SCAR prajmere obezbeđuje bolju reproducibilnost, pouzdanost i preciznost u detekciji i praćenju ciljanog soja (Hunag et al., 2018; Hu et al., 2021). Međutim, u ovom istraživanju, dizajn soj-specifičnih SCAR prajmera na osnovu jedinstvenih RAPD amplikona, se pokazao kao veliki izazov usled umnožavanja nespecifičnih sekvenci koje su bile iste dužine kao i ciljna, soj-specifična sekvenca. Razlog je upravo brojnost *Bacillus* spp. kolekcije, odnosno pojava da rezolucija RAPD metode opada sa povećanjem broja profilisanih sojeva. Uprkos tome, soj-specifični markeri jesu uspešno dizajnirani, što naglašava značaj dobijenih rezultata. Među velikim brojem dobijenih genetičkih profila, smanjuje se verovatnoća detekcije jedinstvenog amplikona, koji pored uslova da zadovoljava dužinu za uspešnu konstrukciju specifičnih prajmera, mora imati dužinu prilagođenu ddPCR metodi, gde je standardni gornji prag 200 bp (Watry et al., 2020). U sličnim studijama se čak ističe i da je optimalan broj izolata za koje se dizajniraju specifični RAPD-SCAR prajmeri 25 (Kałużna et al., 2016; González-García et al., 2019).

Na osnovu svih kriterijuma primenjenih u ovom ostraživanju, prajmeri RAPD272 i OPG5 su pokazali najbolju moć diferencijacije bliskih *Bacillus* spp. izolata iz uzoraka zemljišta, sena, slame i stajskog đubriva. Iako su se ova dva prajmera izdvojila kao prvi izbor u genetičkom profilisanju izolata iz sva tri prirodna staništa, zbog inicijalnih razlika u broju izolata iz svakog uzorka, dobijeni rezultati imaju pretežno značaj kao vodič za odabir prajmera za profilisanje *Bacillus* spp. izolata iz prirode. Među dokazanim biokontrolnim sojevima, prajmerom RAPD272 umnožena je jedinstvena sekvenca u genomu soja *B. amyloliquefaciens* SS-12.6. Međutim, u drugoj fazi istraživanja, izradi SCAR prajmera na osnovu detektovane jedinstvene sekvence SS-12.6, najbolja kombinacija dizajniranih SCAR prajmera umnožavala je nespecifične sekvence u genomima više od polovine izolata iz kolekcije. Dakle, ukoliko je glavni cilj samo genetičko profilisanje *Bacillus* spp. izolata iz prirode, RAPD272 predstavlja najbolji izbor. To potvrđuju i rezultati Gupta & Joia (2016), gde je RAPD-PCR metoda prikazana kao najuspešnija za genetičko profilisanje *Bacillus* spp. izolata. Iako su RAPD272 prajmeri ekstenzivno primenjivani u genotipizaciji *Pseudomonas* spp. izolata, retke su studije koje opisuju njihovu primenu na *Bacillus* spp. izolatima (Emami et al., 2019; Hematzadeh & Haghkhah, 2021). Diskriminatorna moć OPG5 prajmera je bila uporediva sa RAPD272. Primenom ovih prajmera, takođe je umnožena jedinstvena sekvenca biokontrolnog soja *B. velezensis* SS-38.4, veličine 3 kb. Ali, usled ograničenja u pogledu uspešnosti ligacije i transformacije sa velikim DNK fragmentima, a zatim i samog dizajna specifičnih SCAR prajmera na osnovu sekvence koja bi optimalno trebalo da bude manja od 0,8 kb, ova jedinstvena sekvenca nije dalje razmatrana. Iako se prajmer OPB07 nije posebno istakao u proceni diverziteta *Bacillus* spp. izolata, sa ovim prajmerom umnožena je jedinstvena sekvenca na osnovu koje su dizajnirani SCAR prajmeri korišćeni u specifičnoj detekciji i praćenju dinamike populacije *B. velezensis* SS-38.4. Premda su SCAR_{38.4} prajmeri umnožili sekvencu veličine 646 bp u genomima 58 neciljanih izolata, ovaj rezultat je bio zadovoljavajući s obzirom na veličinu kolekcije, koja broji deset puta više izolata od optimalnog za ovaj tip istraživanja. Dodatno, prepoznatljive fenotipske karakteristike soja SS-38.4 (krupne, naborane, roze kolonije sa oreolom na Chromogenic *Bacillus* agaru sa polimiksinom) i izuzetno izražena inhibicija visko virulentnog soja *P. syringae* pv. *aptata* P21, omogućavaju njegovo nedvosmisleno razlikovanje od ostalih 58 sojeva. Ovaj primer kombinovanja molekularnog i fenotipskog pristupa (Gotor-Vila et al., 2018) poboljšava robusnost identifikacije i ističe osobenost SS-38.4 u poređenju sa ostalim sojevima. U suprotnosti sa navedenom uspešnom primenom prajmera, RAPD1247 pokazao se kao neodgovarajući izbor za genetičko profilisanje *Bacillus* spp. izolata iz prirode, sa više od 50% negativnih PCR reakcija. Treba naglasiti da tehnički problemi nisu uzrok izostanka amplifikacije, jer su identični rezultati dobijeni i posle ponavljanja reakcije. Uspešna primena RAPD1247 u genotipizaciji *Bacillus* spp. opisana je u Batinić et al. (1997) i Galloriet al. (1998) na dosta manjoj kolekciji, dok novijih podataka o primeni ovog prajmera na *Bacillus* spp. izolatima nedostaje. ERIC PCR je takođe, slabiji metod diskriminacije *Bacillus* spp. izolata, što može biti i očekivano s obzirom da predstavlja metod izbora u genotipizaciji *E. coli* i *Salmonella typhimurium* kod kojih je prvi put i opisano prisustvo ERIC elemenata (Versalovic et al., 1991). U profilisanju *Bacillus* spp. izolata, pretežno su korišćeni za predstavnike „*B. cereus*“ grupe. Generalno, rezultati genotipizacije se razlikuju od istraživanja do istraživanja. Neki autori ističu veću dikriminatornu moć ERIC prajmera (Subbanna et al., 2018; Orce et al., 2021), dok drugi, pak, ističu BOX i GTG u genotipizaciji *Bacillus* spp. izolata (Getahun et al., 2020). Imajući u vidu veliki polimorfizam bliskih *Bacillus* spp. izolata iz prirode, varijabilnost u rezultatima nije iznenađujuća.

Kako je dužina jedinstvenog fragmenta umnoženog dizajniranim i odabranim SCAR_{38.4} prajmerima veća od standarda za ddPCR amplifikaciju, ispitan je niz modifikacija protokola kako bi se optimizovala metoda detekcije i usavršio protokol. Umnožavanja sekvenci preko 200 bp ddPCR metodom nije uobičajeno i opisano je pretežno za eukariotske gene (Fernando et al., 2018; Zhang et al., 2022; Gai et al., 2023). Izuzetak je istraživanje Manzari et al. (2020), u kojem je optimizovan protokol za umnožavanje fragmenta gena za 16S rRNK veličine preko 600 bp. Iako je za ddPCR metod tipično da temperatura hibridizacije ne prelazi 60 °C, pri čemu sama hibridizacija ne traje duže od jednog minuta (Picard et al., 2022), za umnožavanje većih fragmenta pokazalo se da je

ključno povećanje temperature (Eischeid et al., 2022), uz produženje vremena hibridizacije (Maier et al., 2019). Konkretno za amplifikaciju specifične sekvence soja SS-38.4, hibridizacija je vršena na 65 °C u trajanju od pet minuta.

Sposobnost kolonizacije SS-38.4 procenjena je na osnovu brojnosti i stabilnosti populacije ovog soja (Weng et al., 2013), kombinovanjem tradicionalne (mikrobiološke) i molekularne metode (Xu et al., 2024). Mikrobiološka metoda zasnivala se na gajenju sojeva, zasejavanju odgovarajućih razblaženja uzorka iz filofsere na selektivne i diferencijalne podloge, brojanje kolonija nakon inkubacije i izražavanje dobijenih vrednosti kao CFU (*colony forming unit*) po cm² površine lista. Prednost ove metode je određivanje brojnosti isključivo vijabilnih ćelija, kao i ekonomičnost i jednostavnost izvođenja. Molekularne metode primenjene u ovom radu zasnivale su se na lančanoj reakciji polimeraze. Generalno, metode zasnovane na PCR reakcijama obuhvataju: kvantitativno 16S rDNK metabarkodiranje, kvantitativni qPCR i *droplet digital* ddPCR (Xu et al., 2024). Kvantifikacija metabarkodiranjem 16S rRNK, predstavlja često primenjivanu metodu za procenu brojnosti mikroorganizama u zajednici. Međutim, usled jako velike sličnosti sekvenci 16S rRNK između različitih sojeva *Bacillus* spp., primena ove metode nije pogodna ukoliko je cilj istraživanja precizno praćenje određenog soja (Manfredini et al., 2021). Kombinovanje qPCR i ddPCR metoda sa soj-specifičnim prajmerima i probama, kao na primer SCAR, trenutno predstavlja najbolji izbor za preciznu kvantifikaciju i praćenje biokontrolnog/PGP soja (Xie et al., 2020). Metoda ddPCR, iako skuplja od qPCR, omogućava apsolutnu kvantifikaciju ćelija i smanjenu osetljivost na inhibitore. Navedene pozitivne osobine su ostvarene zahvaljujući principu metode, koji se zasniva na razbijanju uzoraka na kapljice (emulzija voda u ulju), pri čemu svaka kapljica može biti prazna (negativna) ili sadržati jednu (ili više matrica ciljane DNK)-pozitivna kapljica. U svim pozitivnim kapljicama se odvijaju PCR reakcije, a apsolutna kvantifikacija se vrši na osnovu intenziteta fluorescencije oslobođene degradacijom proba nakon amplifikacije i statističkom korekcijom primenom Poasonove raspodele (Pacocho et al., 2019). Kao nedostatak ddPCR metode u literaturi se ističe nemogućnost razlikovanja vijabilnih ćelija, tako da upoređivanje rezultata sa drugim metodama, npr. određivanjem CFU/cm² može dati optimalnu sliku dinamike populacije biokontrolnog/PGP *Bacillus* spp. soja na biljci (Scheler et al., 2017). Međutim, visok stepen korelacije između tradicionalne mikrobiološke metode, određivanja dinamike populacije brojanjem kolonija i molekularne metode, potvrđuju rezultati poređenja ove dve metode na drugim rodovima bakterija (Grudlewska-Buda et al., 2020; Kiefer et al., 2020). Ovakav rezultat upućuje na svrsishodnost obe metode, u zavisnosti od ciljeva istraživanja, vremenskih ograničenja i dostupnih sredstava za izvođenje istraživanja. Uprkos očekivanju veće procenjene apsolutne brojnosti populacije SS-38.4 određene putem ddPCR metode nego mikrobiološkim odgajivačkim metodama, rezultati su bili veoma slični. Posledica blagog pada ddPCR vrednosti je upravo visoka preciznost i senzitivnost metode, kojom se detektuju i najmanje promene koncentracije (Gobert et al., 2018), do kojih može doći usled zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka (Long et al., 2022). Kako navode Hüge et al. (2022), čak i jedan ciklus zamrzavanja i odmrzavanja značajno utiče na promenu koncentracije DNK koju detektuje ddPCR, ali ne i druge manje osetljive metode poput qPCR. S obzirom na sličnost rezultata tradicionalne metode i ddPCR, u cilju preciznijeg poređenja brojnosti populacije biokontrolnog soja SS-38.4 sa fitopatogenim sojem P21, korišćene su vrednosti dobijene brojanjem kolonija kao objektivnije merilo preživljavanja biokontrolnog soja.

Uobičajen put u biokontrolnim istraživanjima je primena biokontrolnog soja koji vodi poreklo iz istog ekosistema kao i biljni patogen sa kojim stupa u antagonistički odnos (Fessia et al., 2022). Međutim, impresivna biokontrolna aktivnost zemljišnog soja SS-38.4 protiv filofsfernog patogena *in vitro*, motivisala je testiranje preživljavanja, kolonizacije i biokontrolne aktivnosti ovog soja u filosferi šećerne repe. Iako je biokontrolna aktivnost soja SS-38.4 protiv soja P21 već potvrđena *in planta* u prethodnim istraživanjima u kojima su SS-38.4 i P21 zajedno inokulisani u list u vidu kokultura, to ne odražava realne uslove primene na terenu. Ovo istraživanje predstavlja prvi vid evaluacije biokontrolnog efekta soja SS-38.4 u uslovima realne primene u polju - tretmanom listova prskanjem, sa vremenskim razmakom između primene biokontrolnog soja i inokulacije patogena. U kontrolnim biljnim grupama, na koje su suspenzije SS-38.4 i P21

primenjene odvojeno, populacija biljnog patogena je bila približno dvostruko brojnija od biokontrolnog soja. To je i očekivano, s obzirom na prilagođenost filozofnog patogena abiotičkim faktorima i efikasnoj kolonizaciji površine i unutrašnjosti biljnih tkiva. Takođe, ističe se izuzetan rezultat preventivnog T1 tretmana, u kome je brojnost populacije soja SS-38.4 bila uporediva sa vrednošću u kontrolnoj grupi, dok je brojnost populacije P21 postepeno opadala, do potpunog odsustva rasta 14. dana. U T2 tretmanu, primećen je takođe pad brojnosti patogena, ali ne tako drastičan kao u T1. U preventivnom tretmanu biokontrolni soj se primenjuje prvi, osiguravajući vreme neophodno za adaptaciju i osnivanje populacije u novoj ekološkoj niši, pre njene eksploatacije od strane bolje prilagođenog patogena. Analizom ovih rezultata može se potvrditi teza da uspešna inhibicija patogena zahteva sinergističko delovanje različitih biokontrolnih mehanizama (Etesami et al., 2023). Preventivna primena SS-38.4 favorizuje i poželjniju strategiju *Bacillus* spp. predstavnika u interakciji sa *Pseudomonas* spp. - defanzivne mehanizme koji sprečavaju kompetitora da nadjača *Bacillus* spp. (Lyng & Kovács, 2023). Uspešnost preventivnih biokontrolnih tretmana se naglašava i protiv drugih vrsta biljnih patogena i na različitim biljkama (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2022). U T2 tretmanu je ta prednost „prvog dolaska“ uskraćena. Dobijeni rezultati su potkrepljeni i statističkom analizom RDA sa ANOVA testom u kojoj se jasno ističe korelacija brojnosti SS-38.4 u kontrolnom, T1 i T2 tretmanu, označavajući stabilnost uspostavljene populacije. Odnosno, potvrđujući da prvobitno osvajanje niše od strane SS-38.4 sprečava uspostavljanje stabilne populacije P21 i obavljanje životnog ciklusa koji vodi razvoju simptoma bolesti lisne pegavosti. Na osnovu navedenih rezultata, kao dominantan mehanizam može se izdvojiti upravo zauzimanje niše kompeticijom za prostor i limitiranjem nutrijenata, praćeno produkcijom antimikrobnih jedinjenja, kao pomoćnog mehanizma.

Prisustvo gena za različite lipopeptide detektovano je u genomu soja SS-38.4, a njihova aktivnost je dokazana u *in vitro* i *in planta* testovima kroz inhibiciju soja P21, kao i slabije virulentnog *P. syringae* pv. *aptata* soja P17 i drugih biljnih patogena - *P. carotovorum*, *X. oryzae* i *E. amylovora* (Dimkić et al., 2015; Dimkić et al., 2017). Pored dva soja, SS-8.1.2 i SS-36.3, koja su se izdvojila u ovom radu, i lipopeptidni ekstrakt soja SS-38.4 pokazao je izraženu inhibitornu aktivnost protiv P21 i P17.

Genom soja SS-38.4 sadrži mnoštvo gena za antimikrobna jedinjenja i to pretežno neribozomalno sintetisanih peptida (bacilizin, makrolaktin H, bacilen, dificidin i fengicin). Ova jedinjenja poseduju pretežno antifungalnu aktivnost i inhibitorno dejstvo na gram-pozitivne bakterije, kao i ulogu u indukciji sistemske rezistencije (Scholz et al., 2014; Wu et al., 2018). Jedino je lipopeptid fengicin opisan kao antimikrobni agens protiv *P. syringae* (Malviya et al., 2020). Takođe, *in silico* analiza je otkrila i potencijalno nove biosintetičke klastere, uključujući locilomicinski, sa samo 21% sličnosti sekvence sa već poznatim klasterom, i butirozinski klaster sa 7% sličnosti, kao i dva neidentifikovana klastera, čiji su mogući produkti jedinjenja iz klase poliketida ili terpena, koja potencijalno mogu ostvariti negativno dejstvo na *P. syringae* pv. *aptata*. Veliki broj identifikovanih biosintetskih klastera i potencijal za sintezu raznovrsnih antimikrobnih jedinjenja ukazuju na to da SS-38.4 može biti efikasan i protiv drugih biljnih patogena, ne samo protiv *P. syringae* pv. *aptata*. Međutim, na sintezu sekundarnih metabolita veoma utiču faktori sredine, koji su posebno oštri u filozferi (Meena et al., 2018; Moreno-Velandia et al., 2021). Ekspresija gena za sintezu antimikrobnih jedinjenja kod mikroorganizama u filozferi je regulisana delovanjem abiotičkih i biotičkih faktora. Nepovoljni i promenljivi uslovi sredine značajno utiču na metaboličke aktivnosti mikroorganizama, a time i na njihovu sposobnost sinteze antimikrobnih metabolita (Bashir et al., 2022). Pored toga, selekcioni pritisak potiče i od biotičkih faktora, uključujući interakcije sa prisutnom mikrobiotom i specifičnim fitopatogenima, što od mikroorganizama zahteva aktiviranje mehanizama odbrane. Primer je istraživanje Yan et al. (2021) koje je pokazalo da rasprostranjenost gena za rezistentnost na antibiotike u filozferi pokazuje najveću korelaciju sa sastavom trenutno prisutnih bakterijskih, gljivičnih i zajednica protista.

Iako je soj SS-38.4 prvobitno identifikovan kao *B. amyloliquefaciens* na osnovu sekvenciranja gena za 16S rRNK (Dimkić et al., 2017) i pod tim imenom se navodi u prethodnim istraživanjima (Dimkić et al., 2015; Jamshidi-Aidji and Morlock, 2018; Nikolić et al., 2019; Rosić

et al., 2023; Dobrzyński et al., 2023; Marković et al., 2023), u ovom radu je metodom sekvenciranja celokupnog genoma i komparativnom genetičkom analizom utvrđeno da pripada vrsti *B. velezensis*. U ovom slučaju reklasifikacija nije bila ekstremna, ali svakako ističe probleme u identifikaciji i taksonomiji predstavnika roda *Bacillus*, posebno ukoliko se vrši samo na osnovu 16S rDNK sekvence (Fan et al., 2017). Vrste *B. velezensis* i *B. amyloliquefaciens* su jako bliske i ispoljavaju slične fenotipske, fiziološke, biohemijske i filogenetske karakteristike, što sa skoro identičnim 16S rDNK sekvencama često doprinosi njihovoj pogrešnoj identifikaciji (Huynh et al., 2022). Razlikovanje ove dve vrste zahteva ili uporednu analizu celih genoma ili umnožavanje karakterističnih gena. U pitanju su geni za dva neribozomalno sintetisana peptida iz klase poliketida, dificidin i makrolaktin H, koji su prisutni u genomu *B. velezensis*, ali ne i *B. amyloliquefaciens* (Fan et al., 2017; Fan et al., 2018; Grady et al., 2019). Kao još jedna diskriminatorna osobina se navodi prisustvo gena za alfa-amilazu (*amyA*) kod *B. amyloliquefaciens* (Borriss et al., 2011; Rückert et al., 2011). U analizi genoma SS-38.4 potvrđeno je prisustvo makrolaktinskog i dificidinskog biosintetičkog klastera, koji su pokazali 100% sličnost sa istim klasterima kod *B. velezensis* FZB42. Takođe, između gena za alfa-amilazu u SS-38.4 genomu i sekvence *amyA* gena *B. amyloliquefaciens* (Uniprot name: D2M30_1705) utvrđena je sličnost od samo 23,24%, dok je 100% sličnost primećena sa skrob-vezujućim proteinom *B. velezensis*. Potvrda identifikacije SS-38.4 proizilazi i iz filogenetske analize, u kojoj je 13 *B. amyloliquefaciens* sojeva (uključujući i SS-38.4) grupisano zajedno sa *B. velezensis* sojevima na osnovu digitalne DNK-DNK hibridizacije i ANI vrednosti. Dodatnu pažnju treba usmeriti i na sojeve *B. amyloliquefaciens* GKT04, JP3042 i HM618, koji su pokazali najveću genetičku sličnost sa *B. velezensis* SS-38.4 i FZB42. Značajno je istaći i da je u genomu GKT04 soja u komparativnoj genetičkoj analizi sa SS-38.4 i FZB42, takođe otkriven gen za dificidin i makrolaktin H.

Premda je SS-38.4 primarno istraživan kao biokontrolni soj, a njegove PGP osobine, posmatrane kao dodatni mehanizmi biološke kontrole, u budućim istraživanjima je svakako značajno ispitati ulogu ovog soja u pospešivanju rasta i prinosa šećerne repe. Kao pomoćni biokontrolni mehanizmi, PGP osobine soja SS-38.4 analizirane su *in silico* i *in vitro*. Kao najzapaženija osobina izdvaja se produkcija siderofora, sa SPI od 3,2 cm, što se smatra prilično izraženom aktivnošću u poređenju sa SPI soja P21, potvrđujući značaj kompeticije za nutrijente u biokontroli. Soj SS-38.4 produkuje kateholni tip siderofora, identifikovan kao bacilibaktin, dominantno prisutan kod gram-pozitivnih bakterija i vrsta *Bacillus* roda. Bacilibaktin je opisan i kao antimikrobni agens, tako da pored indirektnog inhibitornog, poseduje i baktericidno dejstvo tj. ubija ćelije *P. syringae*, protiv koga je posebno efikasan (Dimopoulou et al., 2023). Što se biljnih hormona tiče, patogeni soj P21 je pokazao veću aktivnost produkcije IAA, koja predstavlja vid adaptacije za bolju kolonizaciju biljke i najverovatnije ima neznatan uticaj na njegovu interakciju sa SS-38.4 (Kramer et al., 2020; Miljaković et al., 2020). Među VOCs u genomu SS-38.4 detektovan je gen za sintezu 2,3-butandiola, koji ostvaruje zaštitnu ulogu indukcijom sistemske rezistencije. U novijim istraživanjima opisano je i njegovo direktno supresivno dejstvo na biljne patogene. Međutim, taj mehanizam pokazao se značajnijim u rizosferi (Yi et al., 2016). Među genima za ekstracelularne enzime nisu detektovani geni za hitinaze, što ukazuje na to da soj SS-38.4 verovatno ne ostvaruje antifungalnu aktivnost putem razgradnje ćelijskih zidova gljiva. Ipak, prethodna istraživanja su potvrdila njegovu antifungalnu aktivnost, najverovatnije posredovanu drugim mehanizmima, dok rezultati ovog rada dodatno potkrepljuju njegov potencijal kao biokontrolni agens protiv bakterijskih biljnih patogena.

U genomu soja SS-38.4 identifikovano je devet gena povezanih sa solubilizacijom fosfata, ali nije detektovan *pqq* operon, koji ima ključnu ulogu u ovom procesu (Zubair et al., 2019). Nasuprot tome, *pqq* operon je bio prisutan u genomu soja P21 (Slika 27, Prilog 41). Takođe, kod soja SS-38.4 identifikovani su *gltA* i *mdh* geni, odgovorni za sintezu i transport jabučne i limunske kiseline, koje doprinose solubilizaciji cinka, mangana i kalijuma (Upadhyay et al., 2021). Ovi geni nisu pronađeni u genomu soja P21, ali je kod njega detektovan veći broj gena za transportere mangana i cinka u poređenju sa SS-38.4. Kod oba soja zabeleženo je prisustvo gena za sintezu auksina putem triptofan-zavisnog puta (Slika 27, Prilog 41). Ključni gen za sintezu ACC deaminaze

– *acdS* (Tian et al., 2022), kao i *nif* operon odgovoran za azotofiksaciju, nisu identifikovani ni kod soja SS-38.4, ni kod P21. U genomima SS-38.4 i P21 detektovano je redom 34 i 40 gena povezanih sa pokretljivošću, među kojima su najznačajniji bili *flg*, *fli*, *flh*, *fle*, *mot* i *rpo* geni (Ke et al., 2015; Slika 27, Prilog 41). Pored toga, kod soja SS-38.4 identifikovan je i gen za AHL-laktonazu tipa YtnP (Đokić et al., 2022).

Izmerena QQ aktivnost soja SS-38.4 bila je prilično slaba u poređenju sa ostalim izolatima iz zemljišta, koji su se pokazali kao najdominantniji producenti AHL-laktonaza u kolekciji. Soj SS-38.4 ispoljio je samo 14,52% inhibitorne aktivnosti u testu inhibicije sinteze violaceina, što je značajno manje u poređenju sa najboljim sojem SS-36.6/2 sa procentom inhibicije 71,7%. Premda je i inhibitorna aktivnost SS-36.6/2 prosečna kada se uporedi sa rezultatima drugih istraživanja, gde procenat inhibicije sinteze violaceina iznosi i 80-90% (Musthafa et al., 2011; Devi et al., 2018). Uticaj spoljašnjih faktora poput temperature, pH, i interferirajućih supstanci u medijumu može značajno delovati na aktivnost AHL-laktonaza. Metoda kvantifikacije aktivnosti AHL-laktonaza putem inhibicije sinteze violaceina je dosta podložna uticajima navedenih faktora (Chen et al., 2010; Garge et al., 2016; Reina et al., 2019), međutim, svakako može predstavljati dobar vodič za selekciju sojeva čiji će se izolovani enzimi detaljnije ispitivati.

Pored primećene sličnosti aminokiselinskih sekvenci *aiiA* gena između izolata iz zemljišta, sena, slame i stajskog đubriva, postoje značajne razlike u aktivnosti laktonaza. Sekvence *aiiA* gena su konzervisane među predstavnicima roda *Bacillus* i takođe se mogu koristiti za analizu filogenetskih odnosa između izolata (Molina et al., 2003; Noor et al., 2022). Mada, pretežno za okvirnu procenu, s obzirom na to da se na filogenetskom stablu jasno uočavaju granice samo između predstavnika „*B. subtilis*“ i „*B. cereus*“ grupe (Fan et al., 2017; Hernández-Flores et al., 2020).

Kod biokontrolnog soja SS-38.4 i još tri izolata (SS-10.4.2, SS-16.4, SS-19.2) nije detektovan *aiiA* gen za AHL-laktonazu. Analizom genoma SS-38.4 ustanovljeno da je QQ aktivnost soja SS-38.4 posledica prisustva YtnP laktonaze. Ova laktonaza je relativno slabo istražena. U poređenju sa široko proučavanom AiiA laktonazom kod vrsta roda *Bacillus*, nedostaju podaci o specifičnosti YtnP laktonaze za supstrat (prema različitim AHL molekulima), katalitičkoj efikasnosti i stabilnosti pri različitim uslovima. Do sada je ispitivana samo uporedna aktivnost ove dve metalo- β -laktamaze izolovane iz predstavnika roda *Burkholderia* (Malešević et al., 2020). Uočene su razlike u specifičnosti i efikasnosti razgradnje supstrata, zavisno od dužine lanca AHL. Kako bi se istražilo da li je slaba aktivnost YtnP laktonaze posledica slabijeg afiniteta za C₆-HSL urađen je „molecular docking“ na konstruisanom modelu enzima. Analiza jeste pokazala skoro pet puta niži afinitet za C₆-HSL u odnosu na AiiA laktonazu. Pored većeg afiniteta vezivanja, veći broj interakcija, precizno uklapanje liganda i složenija mreže interakcija, podržavaju rezultate testa inhibicije violaceina, u kojem je laktonaza AiiA izolata SS36.6/2 pokazala najviši stepen inhibicije, dok je laktonaza YtnP soja SS-38.4 imala najniži procenat inhibicije. U drugim istraživanjima rezultati variraju. Opisan je i izraženiji afinitet YtnP laktonaze za AHL dugog lanca (dužine 12C i 14C) (Đokić et al., 2022), kao i za kratke lance (Schneider et al., 2012). Prema navedenim autorima, specifičnost za tip AHL bi mogla biti osobina specifična za rod bakterija, na primer, izraženija specifičnost YtnP laktonaze za duge lance AHL primećena je među predstavnicima *Bacillus* roda, dok je specifičnost za kratke lance opisana kod roda *Burkholderia*.

P. syringae kao signalne molekule u QS mehanizmu koristi DSF (eng. *Diffusible signal factors*), a produkcija AHL do sada je opisana samo kod pojedinih patovara (Morohoshi et al., 2020). U genomu P21 soja nisu uočeni operoni odgovorni za QS putem AHL, kao na primer „Lux-like“ operoni opisani kod drugih *P. syringae* patovara (*AhII* i *AhIR*). Slabija QQ aktivnost soja SS-38.4 stoga ne predstavlja ograničenje, ali ni prednost u biološkoj kontroli P21.

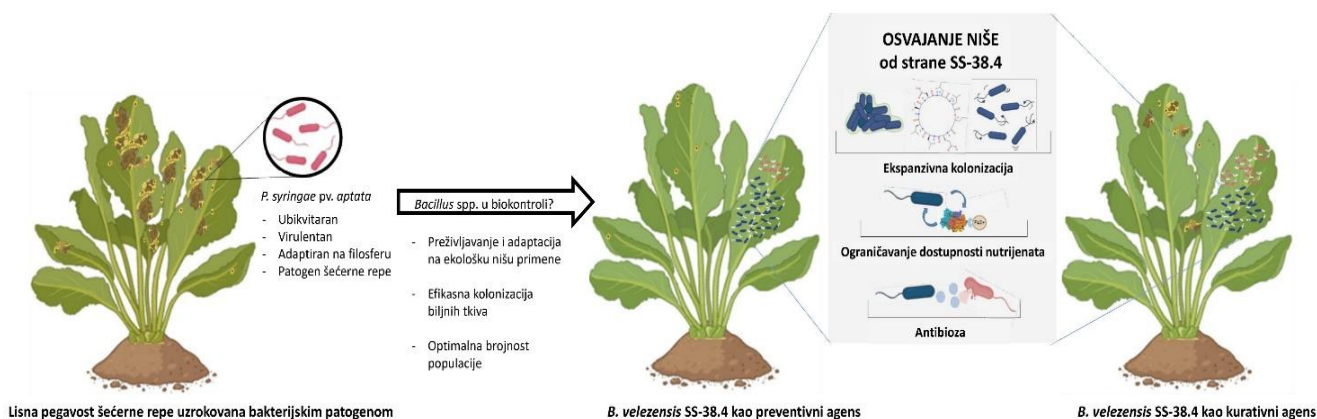
Jedna od najizraženijih razlika između SS-38.4 i P21 leži u ekspresiji gena za pokretljivost i formiranje biofilma. Iako oba soja poseduju slične gene, SS-38.4 je u *in vitro* testovima pokazao veći stepen pokretljivosti, posebno tipa plivanja. U genomu SS-38.4 detektovani su brojni geni odgovorni za formiranje biofilma i produkciju surfaktina, čija je aktivnost potvrđena formiranjem biofilma tipa pelikule. Uprkos prisustvu gena za sintezu EPS (alginat, levan-sukraza) u genomu

P21, sposobnost formiranja biofilma nije primećena. U istraživanjima Arnauteli et al. (2021) i Molina-Santiago et al. (2019), pokazano je da ekstracelularni matriks *B. subtilis* sprečava invaziju *P. chlororaphis*, čime se ističe značajna uloga sposobnosti formiranja biofilma i produkcije surfaktina kod biokontrolnih sojeva. Izraženost osobina odgovornih za kolonizaciju biljnih tkiva, pokretljivosti, formiranja biofilma i sinteze surfaktina, ukazuje da biokontrolni soj iz zemljišta može efikasno kolonizovati površinu listova i koristiti navedene osobine kao primarni mehanizam suzbijanja biljnog patogena.

U pogledu gena sa ulogama u preživljavanju i adaptaciji na uslove u filosferi, u genomu SS-38.4, identifikovani su geni za odgovor na osmotski stres, gladovanje („stringent response“) i reparaciju oštećenja DNK indukovanih UV-zračenjem, koji uz sposobnost formiranja biofilma, pružaju dobru zaštitu od nepovoljnih faktora sredine.

Na kraju, značajno je istaći da analizom genoma SS-38.4 nisu pronađeni poznati geni za toksine, faktore virulencije i superantigeni, što potvrđuje bezbednost primene ovog soja na biljnim kulturama za humanu upotrebu.

Zemljišni soj *B. velezensis* SS-38.4 (prethodno *B. amyloliquefaciens*) istakao se svojim brojnim povoljnim osobinama detektovanim u *in silico* istraživanjima i potvrđenim *in vitro* i *in planta* testovima, kao soj sa velikim potencijalom za prevazilaženje problema biokontrolne u poljskim uslovima. Soj SS-38.4 jako uspešno kolonizuje ne-matičnu nišu (Slika 28) i održava stabilnu brojnost populacije tokom sedam dana. Zahvaljujući tome, ovaj soj sprečava kolonizaciju *P. syringae* pv. *aptata* P21 i razvoj simptoma lisne pegavosti šećerne repe, posebno primenjen preventivno, kao protektivni agens. Takođe, optimizacija metode SCAR_{38.4}-ddPCR, omogućiće praćenje dinamike populacije SS-38.4 u polju i precizno praćenje sudbine SS-38.4 pri različitim biotičkim i abiotičkim faktorima. To će omogućiti i određivanje i optimizaciju doze i frekvencije primene budućeg biokontrolnog agensa na bazi ovog soja.



Slika 28. Biokontrolni soj *B. velezensis* SS-38.4 uspešno osvaja filosferu zahvaljujući dobroj sposobnosti kolonizacije, ograničavanja dostupnosti esencijalnih nutrijenata biljnom patogenu i sintezi jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću. Navedene osobine su posebno izražene pri primeni SS-38.4 kao preventivnog biokontrolnog agensa. Preuzeto i modifikovano iz Rosić et al. (2025b).

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Kao najbolji izbor za genetičko profilisanje i procenu polimorfizma između *Bacillus* spp. izolata iz sva tri analizirana staništa (zemljište, seno, slama i stajsko đubrivo) pokazala se RAPD 272-PCR metoda.
2. Jedinstvene DNK sekvence umnožene RAPD i rep prajmerima uočene su u genetičkim profilima tri biokontrolna izolata: *B. velezensis* SS-38.4 (prajmer OPB 07), *B. amyloliquefaciens* SS 12.6 (prajmer RAPD 272) i *B. pumilus* SS-8.1.2 (prajmer OPO 02).
3. Najveću specifičnost pokazao je par SCAR prajmera za soj *B. velezensis* SS-38.4, dizajniran na osnovu jedinstvene sekvence umnožene OPB 07 prajmerom. RAPD-SCAR_{38.4} prajmeri su umnožili amplicon dužine 646 bp kod još 58 izolata.
4. Ključni korak u optimizaciji ddPCR metode za umnožavanje 646 bp duge sekvence sa RAPD-SCAR_{38.4} prajmerima je bio povećanje temperature hibridizacije na 65 °C i produženje vremena hibridizacije na pet minuta.
5. Između tradicionalne mikrobiološke metode određivanja brojnosti bakterija i SCAR_{38.4}-ddPCR metode utvrđena je visoka pozitivna korelacija u vrednostima brojnosti populacije *B. velezensis* SS-38.4 u kontrolnoj grupi biljaka i tretmanima T1 i T2.
6. U poređenju sa šest sojeva (SS-6.6.1, SS-8.1.2, SS-10.6, SS-30.5, SS-36.3 i SS-20.1), koji su u ovom istraživanju pokazali biokontrolnu aktivnost protiv P21 i P17, soj SS-38.4 postigao je najbolje rezultate.
7. Od 78 sojeva u kolekciji među kojima je potvrđena *quorum quenching* aktivnost, SS-38.4 je pokazao najslabiju aktivnost, za koju je potencijalno odgovoran slab afinitet YtnP laktonaze ka C₆-HSL ligandu. Model YtnP laktonaze SS-38.4 pokazao je pet puta slabiji afinitet za C₆-HSL u odnosu na model AiiA laktonaze soja SS-36.6/2 sa najizraženijom *quorum quenching* aktivnošću.
8. Soj *B. velezensis* SS-38.4 izolovan iz zemljišta uspešno preživljava i održava stabilnu brojnost svoje populacije u filosferi šećerne repe. U kontrolnim grupama brojnost populacija SS-38.4 i P21 bila je stabilna zaključno sa sedmim danom od tretiranja listova šećerne repe. U kontrolnoj grupi zabeležena je očekivana brojnost – prosečna brojnost soja SS-38.4 bila je manja u odnosu na soj P21. Pad brojnosti populacija oba soja uočen je 14. dana.
9. Oba tretmana rezultirala su smanjenjem brojnosti populacije patogena P21. Ipak, preventivna primena SS-38.4 u tretmanu T1 pokazala se efektivnijom, izazivajući postepeni i kontinuirani pad brojnosti tokom petog (2,75 log₁₀ CFU/cm²) i sedmog dana (2,62 log₁₀ CFU/cm²), koji je kulminirao potpunim izostankom rasta P21 14. dana.
10. RDA analiza potvrdila je vezu između pada brojnosti P21 izazvane prisustvom SS-38.4 i smanjenja površine listova zahvaćene simptomima, posebno u tretmanu T1. U proseku, 13,45% površine listova bilo je obuhvaćeno simptomima u kontrolnoj grupi tretiranoj samo patogenom, dok je u tretmanu T1 iznosila 0,85%.
11. Na osnovu dDDH i ANI analize soj SS-38.4 precizno je identifikovan kao *B. velezensis* i grupisan zajedno sa 13 *B. amyloliquefaciens* i 15 *B. velezensis* sojeva. U obe analize, soj SS-38.4 raspoređen je u jasno odvojenu grupu u okviru klastera, koju su činili sojevi *B. amyloliquefaciens* GKT04, JP3042, HM618 i *B. velezensis* FZB42.

12. Komparativna genetička analiza potvrdila je veliku sličnost između sojeva SS-38.4 i GKT04, JP3042, HM618 i FZB42 na osnovu procenta konzerviranih esencijalnih gena (78,1%) i malog broja jedinstvenih gena (97 u genomu SS-38.4). Takođe, analiza gena asociranih sa promocijom rasta biljaka, kolonizacijom biljaka, sintezom ekstracelularnih enzima, produkcijom antimikrobnih jedinjenja i otpornošću na negativne faktore sredine potvrdila je visoku sličnost između genoma ovih pet sojeva.

13. Uporednom analizom genetičkog sadržaja sa genomom P21 i komparativnim *in vitro* testovima, zaključeno je da mehanizmi biokontrolne aktivnosti soja SS-38.4 uključuju kompeticiju za prostor i nutrijente, kao i produkciju antimikrobnih sekundarnih metabolita. Geni za sintezu surfaktina, formiranje biofilma, pokretljivost i produkciju siderofora detektovani u genomu soja SS-38.4, čija je aktivnost potvrđena *in vitro* testovima, mogu biti odgovorni za izuzetnu sposobnost SS-38.4 da kolonizuje filozofu.

14. U genomu SS-38.4 otkrivena su dva genska klastera za potencijalno nova antibiotska jedinjenja, koja nisu pokazala sličnost ni sa jednim poznatim klasterom. Mogući krajnji produkt prvog klastera je jedinjenje tipa skvalena ili fitoena, a za drugi je poznata samo veza sa sintezom poliketida.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 12(Suppl 1), 5–16. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>

Ahmad, N., Usman, M., Ahmad, H. R., Sabir, M., Farooqi, Z. U. R., & Shehzad, M. T. (2023). Environmental implications of phosphate-based fertilizer industrial waste and its management practices. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(11), 1326. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11958-4>

Ahmad, T., Xing, F., Nie, C., Cao, C., Xiao, Y., Yu, X., Moosa, A., Liu, Y. (2023). Biocontrol potential of lipopeptides produced by the novel *Bacillus subtilis* strain Y17B against postharvest *Alternaria* fruit rot of cherry. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1150217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1150217>

Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S., & Adebajo, I. (2024). Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*, 64(6), e2300614. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300614>

Ali, Q., Ayaz, M., Mu, G., Hussain, A., Yuanyuan, Q., Yu, C., Xu, Y., Manghwar, H., Gu, Q., Wu, H., & Gao, X. (2022). Revealing plant growth-promoting mechanisms of *Bacillus* strains in elevating rice growth and its interaction with salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 994902. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994902>

Alippi, A. M., & Aguilar, O. M. (1998). Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(1), 21–27. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4748>

Ambreetha, S., & Balachandar, D. (2023). SCAR marker: A potential tool for authentication of agriculturally important microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, 63(1), 4–16. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200419>

Anteljević, M., Rosić, I., Medić, O., Kolarević, S., Berić, T., Stanković, S., & Nikolić, I. (2023). Occurrence of plant pathogenic *Pseudomonas syringae* in the Danube River Basin: Abundance and diversity assessment. *Phytopathological Research*, 5(18). <https://doi.org/10.1186/s42483-023-00174-0>

Arnauteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., & Kovács, Á. T. (2021). *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>

Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2), 127-136. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>

Ayaz, M., Li, C.H., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y.K., Shafiq, M., Ali, F., Yu, X.Y., Yu, Q., Zhao, J.T., Yu, J.W., Qi, R.D., & Huang, W.K. (2023). Bacterial and Fungal Biocontrol Agents for Plant Disease Protection: Journey from Lab to Field, Current Status, Challenges, and Global Perspectives. *Molecules*, 28(18), 6735. <https://doi.org/10.3390/molecules28186735>

Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., Omole, R. K., Johnson, R. M., Uthman, Q. O., & Babalola, O. O. (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1040901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>

Azizoglu, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: A mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology*, 76, 1379–1385. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>

Bahrami, S., Andishmand, H., Pilevar, Z., Hashempour-Baltork, F., Torbati, M., Dadgarnejad, M., Rastegar, H., Mohammadi, S. A., & Azadmard-Damirchi, S. (2024). Innovative perspectives on bacteriocins: Advances in classification, synthesis, mode of action, and food industry applications. *Journal of Applied Microbiology*, 135(11), lxae274. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae274>

Baldy-Chudzik, K. (2001). Rep-PCR—a variant to RAPD or an independent technique of bacteria genotyping? A comparison of the typing properties of rep-PCR with other recognised methods of genotyping of microorganisms. *Acta Microbiologica Polonica*, 50(3-4), 189–204. PMID: 11930988

Baldwin, V. M. (2020). You can't *B. cereus*—A review of *Bacillus cereus* strains that cause anthrax-like disease. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1731. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01731>

Bale, J. S., van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 761–776. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2182>

Bali, E. B., Türkmen, K. E., Erdönmez, D., & Sağlam, N. (2019). Comparative study of inhibitory potential of dietary phytochemicals against quorum sensing activity of and biofilm formation by *Chromobacterium violaceum* 12472, and swimming and swarming behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Food Technology and Biotechnology*, 57, 212–221. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.5823>

Balleux, G., Höfte, M., Arguelles-Arias, A., Deleu, M., & Ongena, M. (2025). *Bacillus* lipopeptides as key players in rhizosphere chemical ecology. *Trends in Microbiology*, 33(1), 80–95. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.10.005>

Bardakci, F., & Skibinski, D. O. F. (1994). Application of the RAPD technique in tilapia fish: Species and subspecies identification. *Heredity*, 73, 117–123. <https://doi.org/10.1038/hdy.1994.110>

Batinić, T., Schmitt, J., Ulrike, M., & Schulz, D. (1997). Construction of RAPD-generated DNA probes for the quantification of *Bacillus subtilis* FZB C and the evaluation of its biocontrol efficiency in the system *Cucumis sativus* - *Pythium ultimum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105, 168–180.

Berić, T., Urdaci, M. C., Stanković, S., & Knežević-Vukčević, J. (2009). RAPD analysis of genetic diversity and qualitative assessment of hydrolytic activities in a collection of *Bacillus* sp. isolate. *Archives of Biological Sciences*, 61(4), 645–652. <https://doi.org/10.2298/ABS0904645B>

Berić, T. (2010). Biohemijska i molekularno genetička karakterizacija izolata *Bacillus* sp. sa područja Srbije (*Doktorska disertacija*, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu).

- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Lau, B. Y., Hoad, G., Winsor, G. L., & Brinkman, F. S. L. (2017). IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
- Bashir, I., War, A. F., Rafiq, I., Reshi, Z. A., Rashid, I., & Shouche, Y. S. (2022). Phyllosphere microbiome: Diversity and functions. *Microbiological Research*, 254, 126888. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126888>
- Besset-Manzoni, Y., Joly, P., Brutel, A., Gerin, F., Soudière, O., Langin, T., & Prigent-Combaret, C. (2019). Does in vitro selection of biocontrol agents guarantee success *in planta*? A study case of wheat protection against *Fusarium* seedling blight by soil bacteria. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225655>
- Bhattacharya, D., Lai, T. K., Saha, A., Selvin, J., & Mukherjee, J. (2021). Structural elucidation and antimicrobial activity of a diketopiperazine isolated from a *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Natural Product Research*, 35(14), 2315-2323. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1672684>
- Blanco Crivelli, X., Cundon, C., Bonino, M. P., Sanin, M. S., & Bentancor, A. (2024). The complex and changing genus *Bacillus*: A diverse bacterial powerhouse for many applications. *Bacteria*, 3(3), 256-270. <https://doi.org/10.3390/bacteria3030017>
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. A., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures, and visualization. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(3), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s002039900127>
- Boone, D. R., Liu, Y., Zhao, Z. J., Balkwill, D. L., Drake, G. R., Stevens, T. O., & Aldrich, H. C. (1995). *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 441-448. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-441>
- Borriss, R., Chen, X. H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spröer, C., Junge, H., Vater, J., Pühler, A., & Klenk, H. P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8), 1786-1801. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023267-0>
- Botrel, D. A., Laborde, M. C. F., Medeiros, F. H. V., Resende, M. L. V., Ribeiro, J., Pedro, M., Pascholati, S. F., & Gusmão, L. F. P. (2018). Saprobic fungi as biocontrol agents of halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) in coffee clones. *Coffee Science*, 13(3). <http://dx.doi.org/10.25186/cs.v13i3.1438>
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

- Broadbent, P., Baker, K. F., & Waterworth, Y. (1971). Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24(6), 925–944. <https://doi.org/10.1071/BI9710925>
- Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Ceciliani, F., Galizzi, A., & Senesi, S. (2005). Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5356–5366. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5356-5366.2005>
- Chakraborty, K., Kizhakkekalam, V. K., Joy, M., & Chakraborty, R. D. (2022). Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(1), 329–340. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11632-0>
- Chandrasekaran, M., Paramasivan, M., & Sahayarayan, J. J. (2023). Microbial volatile organic compounds: An alternative for chemical fertilizers in sustainable agriculture development. *Microorganisms*, 11, 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010042>
- Chandwani, S., Chavan, S. M., Paul, D., & Amaresan, N. (2022). Bacterial inoculations mitigate different forms of iron (Fe) stress and enhance nutrient uptake in rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102326. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102326>
- Chaudhary, R., Nawaz, A., Khattak, Z., Butt, M. A., Fouillaud, M., Dufossé, L., Munir, M., ul Haq, I., & Mukhtar, H. (2024). Microbial bio-control agents: A comprehensive analysis on sustainable pest management in agriculture. *Journal of Agriculture and Food Research*, 18, 101421. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101421>
- Chen, R., Zhou, Z., Cao, Y., Bai, Y., & Yao, B. (2010). High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factories*, 9, 39. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-39>
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17477–17500. <https://doi.org/10.3390/ijms140917477>
- Cho, K. H., Noh, J. H., Park, S. J., Kim, S. H., Kim, D.-H., & Chun, J. A. (2015). Development of sequence-characterized amplified region markers for the identification of grapevine cultivars. *HortScience*, 50(12), 1744–1750. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.12.1744>
- Claus, D., & Fritze, D. (1989). Taxonomy of *Bacillus*. In C. R. Harwood (Ed.), *Bacillus* (pp. 5-26). Plenum Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3502-1_2
- Collier, T., & Van Steenwyk, R. (2004). A critical evaluation of augmentative biological control. *Biological Control*, 31(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.05.001>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>

- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Compant, S., & Sessitsch, A. (2021). What determines successful colonization and expression of biocontrol traits at the belowground level? In M. De Cal, J. Guijarro, & G. Melgarejo (Eds.), *How research can stimulate the development of commercial biological control against plant diseases* (pp. 31–46). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53238-3_3
- Costa Almeida, O. A., de Araujo, N. O., Mulato, A. T. N., Persinoti, G. F., Sforça, M. L., Calderan-Rodrigues, M. J., & de Castro Oliveira, J. V. (2023). Bacterial volatile organic compounds (VOCs) promote growth and induce metabolic changes in rice. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1056082. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1056082>
- Daranas, N., Badosa, E., Montesinos, E., & Bonaterra, A. (2024). Colonization and population dynamics of total, viable, and culturable cells of two biological control strains applied to apricot, peach, and grapevine crops. *Frontiers in Microbiology*, *14*, Article 1324965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1324965>
- Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *36*(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- de Araujo, G. G., Rodrigues, F., Gonçalves, F. L. T., & Galante, D. (2019). Survival and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* strains exposed to simulated high-altitude atmospheric conditions. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44283-3>
- Deb, C. R., & Tatung, M. (2024). Siderophore producing bacteria as biocontrol agents against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*, *165*, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.10.012>
- Delmas, C. E., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I. D., Richart Cervera, S., Delière, L., & Delmotte, F. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: Selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evolutionary Applications*, *9*(5), 709–725. <https://doi.org/10.1111/eva.12368>
- Deng, A., Wang, T., Wang, J., Li, L., Wang, X., Liu, L., & Wen, T. (2023). Adaptive mechanisms of *Bacillus* to near space extreme environments. *Science of the Total Environment*, *886*, 163952. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163952>
- Devarajan, A. K., Muthukrishnan, G., Truu, J., Truu, M., Ostonen, I., Kizhaeral, S. S., Panneerselvam, P., & Kuttalingam Gopalasubramanian, S. (2021). The foliar application of rice phyllosphere bacteria induces drought-stress tolerance in *Oryza sativa* (L.). *Plants*, *10*(2), 387. <https://doi.org/10.3390/plants10020387>
- Devi, K. R., Srinivasan, S., & Ravi, A. V. (2018). Inhibition of quorum sensing-mediated virulence in *Serratia marcescens* by *Bacillus subtilis* R-18. *Microbial Pathogenesis*, *120*, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.023>
- Dhuldhaj, U. P., Singh, R., & Singh, V. K. (2023). Pesticide contamination in agro-ecosystems: Toxicity, impacts, and bio-based management strategies. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*, 9243–9270. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24381-y>

- Dias, E. S., Fortes-Dias, C. L., Stiteler, J. M., Perkins, P. V., & Lawyer, P. G. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40(1), 49-53. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651998000100010>
- Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Nkouamedjo-Fankep, R. C., Harald, P., Hanel, G., Jelonek, L., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). EDGAR3.0: Comparative genomics and phylogenomics on a scalable infrastructure. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), <https://doi.org/10.1093/nar/gkab341>
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., & Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.012>
- Dimkić, I., Berić, T., Stević, T., Pavlović, S., Šavikin, K., Fira, D., & Stanković, S. (2015). Additive and synergistic effects of *Bacillus* spp. isolates and essential oils on the control of phytopathogenic and saprophytic fungi from medicinal plants and marigold seeds. *Biological Control*, 87, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.011>
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., & Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*, 8, 925. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00925>
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D. G., & Skandalis, N. (2021). Direct antibiotic activity of Bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere*. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00376-21>
- Djokic, L., Stankovic, N., Galic, I., Moric, I., Radakovic, N., Šegan, S., Pavic, A., & Senerovic, L. (2022). Novel quorum quenching YtnP lactonase from *Bacillus paralicheniformis* reduces *Pseudomonas aeruginosa* virulence and increases antibiotic efficacy *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 906312. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.906312>
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P., & Kramkowski, K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1194606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194606>
- Donati, I., Cellini, A., Sangiorgio, D., Vanneste, J. L., Scortichini, M., Balestra, G. M., & Spinelli, F. (2020). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, infection dynamics and disease epidemiology. *Microbial Ecology*, 80(1), 81–102. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01459-8>
- Dong, L., Wang, P., Zhao, W., Su, Z., Zhang, X., Lu, X., Li, S., Ma, P., & Guo, Q. (2022). Surfactin and fengycin contribute differentially to the biological activity of *Bacillus subtilis* NCD-2 against cotton verticillium wilt. *Biological Control*, 174, 104999. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104999>
- Ducouso-Détrez, A., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A., & Hijri, M. (2022). Diversity of phosphate chemical forms in soils and their contributions to soil microbial community structure changes. *Microorganisms*, 10(3), 609. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030609>
- Dunlap, C. A. (2019). Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. *Biological Control*, 144, 104996. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104996>

- Efe, D. (2020). Potential plant growth-promoting bacteria with heavy metal resistance. *Current Microbiology*, 77(12), 3861–3868. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02208-8>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
- Eirini, G. P., & Sotiris, E. T. (2023). *Bacillus* species: Factories of plant protective volatile organic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 134(3), lxad037. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad037>
- Eischeid, A. C. (2022). Optimised multiplex droplet digital PCR is more precise, but not more sensitive, than real-time PCR for the detection of allergenic peanut. *Food Additives & Contaminants*, 39(11), 1797-1805. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2126530>
- El-Fouly, M. M., Nofal, O. A., & Mobarak, Z. M. (2001). Effects of soil treatment with iron, manganese, and zinc on growth and micronutrient uptake of sunflower plants grown in high-pH soil. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 187(4), 245–251. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2001.00479.x>
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Ahmed, A. I., Mahmood, M., et al. (2022). Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13, 923880. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>
- Emami, A., Keshavarzi, A., Pirbonyeh, N., & Behbahani, M. R. (2019). Identification of different faces of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in burn patients by genetic fingerprinting. *Gene Reports*, 15, 100377. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100377>
- Eshaghi, E., Nosrati, R., Owlia, P., Malboobi, M. A., Ghaseminejad, P., & Ganjali, M. R. (2019). Zinc solubilization characteristics of efficient siderophore-producing soil bacteria. *Iran Journal of Microbiology*, 11(5), 419–430. PMID: 32148673; PMCID: PMC7049313
- Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2023). Potential use of *Bacillus* spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. *Current Research in Biotechnology*, 5, 100128. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100128>
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "Operational Group B. amyloliquefaciens" within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8, 22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., & Wang, Q. (2017). Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1973. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01973>
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>

- Fazle Rabbee, M., & Baek, K. H. (2020). Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules*, 25(21), 4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
- Felici, C., Vettori, L., Toffanin, A., & Nuti, M. (2008). Development of a strain-specific genomic marker for monitoring a *Bacillus subtilis* biocontrol strain in the rhizosphere of tomato. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 289–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00489.x>
- Fernando, M. R., Jiang, C., Krzyzanowski, G. D., & Ryan, W. L. (2018). Analysis of human blood plasma cell-free DNA fragment size distribution using EvaGreen chemistry based droplet digital PCR assays. *Clinica Chimica Acta*, 483, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.04.017>
- Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of the Total Environment*, 682, 779–799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>
- Fessia, A., Barra, P., Barros, G., & Nesci, A. (2022). Could *Bacillus* biofilms enhance the effectivity of biocontrol strategies in the phyllosphere? *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2148–2166. <https://doi.org/10.1111/jam.15596>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Gai, W., Yu, S. C. Y., Chan, W. T. C., Peng, W., Lau, S. L., Leung, T. Y., Jiang, P., Chan, K. C. A., & Lo, Y. M. D. (2023). Droplet digital PCR is a cost-effective method for analyzing long cell-free DNA in maternal plasma: Application in preeclampsia. *Prenatal Diagnosis*, 43(11), 1385–1393. <https://doi.org/10.1002/pd.6432>
- Gallori, E., Franchi, M., Rinaldi, L., & Vettori, C. (1998). Interspecific transformation of *Bacillus subtilis* by clay-bound DNA in non-sterile soil. *Symbiosis*, 25, 311–322. <http://hdl.handle.net/10222/77667>
- Gao, S., Wu, H., Yu, X., Qian, L., & Gao, X. (2016). Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control*, 98, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.008>
- Gao, J., Zhuang, S., & Zhang, W. (2024). Advances in Plant Auxin Biology: Synthesis, Metabolism, Signaling, Interaction with Other Hormones, and Roles under Abiotic Stress. *Plants*, 13(17), 2523. <https://doi.org/10.3390/plants13172523>
- Garcia, R., Caltagirone, L. E., & Gutierrez, A. P. (1988). Comments on a redefinition of biological control. *BioScience*, 38(10), 692–694. <https://doi.org/10.2307/1310871>
- Garge, S. S., & Nerurkar, A. S. (2016). Attenuation of quorum sensing regulated virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* through an AHL lactonase produced by *Lysinibacillus* sp. Gs50. *PLOS ONE*, 11, e0167344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone>
- Gautam, S., Chauhan, A., Sharma, R., Sehgal, R., & Shirkot, C. K. (2019). Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Microbial Pathogenesis*, 130, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.016>

GelAnalyzer 23.1.1 (available at www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc

Getahun, A., Kiros, S., Muleta, D., & Assefa, F. (2020). Genetic and metabolic diversities of rhizobacteria isolated from degraded soil of Ethiopia. *Heliyon*, 6, e05697. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05697>

Giordano, M., Petropoulos, S. A., & Roupael, Y. (2021). The fate of nitrogen from soil to plants: Influence of agricultural practices in modern agriculture. *Agriculture*, 11(10), 944. <https://doi.org/10.3390/agriculture11100944>

Gobert, G., Cotillard, A., Fourmestraux, C., Pruvost, L., Miguet, J., & Boyer, M. (2018). Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.004>

Gomaa, E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *The Journal of Microbiology*, 50(1), 103–111. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>

González-García, S., Álvarez-Pérez, J. M., Sáenz de Miera, L. E., Cobos, R., Ibañez, A., Díez-Galán, A., Garzón-Jimeno, E., & Coque, J. J. R. (2019). Developing tools for evaluating inoculation methods of biocontrol *Streptomyces* sp. strains into grapevine plants. *PLOS ONE*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211225>

Gormez, A., Sahin, F., Gulluce, M., & Aslan, I. (2013). Identification and characterization of *Pseudomonas syringae* isolated from apricot trees in the Erzurum Province of Turkey and evaluation of cultivar reaction. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 525–532. <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.016>

Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Usall, J., Dashevskaya, S., & Torres, R. (2016). Development of a SCAR marker and a strain-specific genomic marker for the detection of the biocontrol agent strain CPA-8 *Bacillus amyloliquefaciens* (formerly *B. subtilis*). *Annals of Applied Biology*, 169(2), 248–256. <https://doi.org/10.1111/aab.12298>

Grady, E. N., MacDonald, J., Ho, M. T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Renaud, J., & Yuan, Z. C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19(5). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>

Grahovac, J., Pajčin, I., & Vlajkov, V. (2023). *Bacillus* VOCs in the context of biological control. *Antibiotics*, 12(3), 581. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030581>

Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C. Y., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: In-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(5), <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>

Gressel, J. (2024). Four pillars are required to support a successful biocontrol fungus. *Pest Management Science*, 80(1), 35–39. <https://doi.org/10.1002/ps.7417>

Grudlewska-Buda, K., Skowron, K., & Gospodarek-Komkowska, E. (2020). Comparison of the intensity of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* using classical culture-based method and digital droplet PCR. *AMB Express*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01007-5>

- Gupta, A., & Joia, J. (2016). Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: A review. *Journal of Microbial Biochemistry and Technology*, 8, 364–372. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000310>
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753-5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QCAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hafeez, F. Y., Naureen, Z., & Sarwar, A. (2019). Surfactin: An emerging biocontrol tool for agriculture sustainability. In A. Kumar & V. Meena (Eds.), *Plant growth promoting rhizobacteria for agricultural sustainability*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_10
- Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., Nojoumi, S. A., Yazdian, F., Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2022). *Bacillales*: From taxonomy to biotechnological and industrial perspectives. *Microorganisms*, 10(12), 2355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122355>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Abd Allah, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth-promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hashemnejad, F., Barin, M., & Khezri, M. (2021). Isolation and identification of insoluble zinc-solubilising bacteria and evaluation of their ability to solubilise various zinc minerals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 2501–2509. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00540-x>
- Hassanisaadi, M. (2024). Surfactin as a multifaceted biometabolite for sustainable plant defense: A review. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-024-01645-9>
- He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alwindia, D. G., & Zhan, J. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens*, 10(10), 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>
- He, P., Li, S., Xu, S., Fan, H., Wang, Y., Zhou, W., Fu, G., Han, G., Wang, Y. Y., & Zheng, S. J. (2021). Monitoring tritrophic biocontrol interactions between *Bacillus* spp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, tropical race 4, and banana plants *in vivo* based on fluorescent transformation system. *Frontiers in Microbiology*, 12, 754918. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754918>
- Heenan-Daly, D., Coughlan, S., Dillane, E., & Doyle Prestwich, B. (2021). Volatile compounds from *Bacillus*, *Serratia*, and *Pseudomonas* promote growth and alter the transcriptional landscape of *Solanum tuberosum* in a passively ventilated growth system. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628437>
- Hematzadeh, A., & Haghkhah, M. (2021). Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR. *Heliyon*, 7, e07967. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07967>
- Hernández, I., Sant, C., Martínez, R., & Fernández, C. (2020). Design of bacterial strain-specific qPCR assays using NGS data and publicly available resources and its application to track biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00208>

- Hernández-González, I., Moreno-Hagelsieb, G., & Olmedo-Álvarez, G. (2018). Environmentally-driven gene content convergence and the *Bacillus* phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*, *18*(148). <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1261-7>
- Hu, L., & Yang, L. (2019). Time to fight: Molecular mechanisms of age-related resistance. *Phytopathology*, *109*(10), 1685–1695. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-18-0443-RVW>
- Hu, J., Yao, Y., Yang, Y., Gao, C., Zhang, F., Xia, R., Ran, C., Zhang, Z., Liu, C. J., & Zhou, Z. (2021). Advances of intra-species molecular typing analysis of aquatic probiotics approved by the Chinese Ministry of Agriculture. *Reviews in Aquaculture*, *13*, 178–188. <https://doi.org/10.1111/raq.12469>
- Huang, C. H., Liou, J. S., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Developing novel species-specific DNA markers for PCR-based species identification of the *Lactobacillus sakei* group. *Letters in Applied Microbiology*, *66*, 138–144. <https://doi.org/10.1111/lam.12825>
- Huge, B. J., North, D., Mousseau, C. B., Bibby, K., Dovichi, N. J., & Champion, M. M. (2022). Comparison of RT-dPCR and RT-qPCR and the effects of freeze–thaw cycle and glycine release buffer for wastewater SARS-CoV-2 analysis. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25187-1>
- Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson’s index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, *26*(11), 2465–2466. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
- Hussain, S., Tai, B., Ali, M., Jahan, I., Sakina, S., Wang, G., Zhang, X., Yin, Y., & Xing, F. (2024). Antifungal potential of lipopeptides produced by the *Bacillus siamensis* Sh420 strain against *Fusarium graminearum*. *Microbiology Spectrum*, *12*, e04008-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04008-23>
- Huynh, T., Vörös, M., Kedves, O., Turbat, A., Sipos, G., Leitgeb, B., Kredics, L., Vágvölgyi, C., & Szekeres, A. (2022). Discrimination between the two closely related species of the operational group *B. amyloliquefaciens* based on whole-cell fatty acid profiling. *Microorganisms*, *10*(418). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020418>
- Ijaz, A., Mumtaz, M. Z., Wang, X., Ahmad, M., Saqib, M., Maqbool, H., Zaheer, A., Wang, W., & Mustafa, A. (2021). Insights into manganese solubilizing *Bacillus* spp. for improving plant growth and manganese uptake in maize. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 719504. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.719504>
- Investment Centre Division. (2013). *Serbia: Sugar sector review* (1st ed.). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/i3203e>
- Iqbal, O., Syed, R. N., Rajput, N. A., Wang, Y., Lodhi, A. M., Khan, R., Jibril, S. M., Atiq, M., & Li, C. (2024). Antagonistic activity of two *Bacillus* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* (FOC-1) causing *Fusarium* wilt and growth promotion activity of chili plant. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1388439. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1388439>
- Jain, S., Varma, A., & Choudhary, D. K. (2021). Perspectives on nitrogen-fixing *Bacillus* species. In C. Cruz, K. Vishwakarma, D. K. Choudhary, & A. Varma (Eds.), *Soil nitrogen ecology* (pp. 18). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-71206-8_18

- Jamshidi-Aidji, M., Dimkić, I., Ristivojević, P., Stanković, S., & Morlock, G. E. (2019). Effect-directed screening of *Bacillus* lipopeptide extracts via hyphenated high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1605*, 460366. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460366>
- Jang, H., Kim, S. T., & Sang, M. K. (2022). Suppressive effect of bioactive extracts of *Bacillus* sp. H8-1 and *Bacillus* sp. K203 on tomato wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microorganisms*, *10*(2), 403. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020403>
- Jang, S., Choi, S. K., Zhang, H., Zhang, S., Ryu, C. M., & Kloepper, J. W. (2023). History of a model plant growth-promoting rhizobacterium, *Bacillus velezensis* GB03: From isolation to commercialization. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1279896. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1279896>
- Ji, C., Chen, Z., Kong, X., Xin, Z., Sun, F., Xing, J., et al. (2022). Biocontrol and plant growth promotion by combined *Bacillus* spp. inoculation affecting pathogen and AMF communities in the wheat rhizosphere at low salt stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1043171. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1043171>
- Joanna, B., Michal, B., Piotr, D., Agnieszka, W., Dorota, K., & Izabela, W. (2018). Chapter 13 - Sugar beet pulp as a source of valuable biotechnological products. In *Handbook of Food Bioengineering: Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 359-392). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00013-X>
- Kałużna, M., Albuquerque, P., Tavares, F., Sobiczewski, P., & Puławska, J. (2016). Development of SCAR markers for rapid and specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* races 1 and 2, using conventional and real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(8), 3693–3711. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7295-0>
- Kamath, A., Sharma, A., Shukla, A., Parmar, P., Patel, D. (2025) Fortifying plant fortresses: siderophores in defense against *Cercospora* leaf spot disease in *Vigna radiata* L. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1492139. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1492139>
- Karačić, V., Miljaković, D., Marinković, J., Ignjatov, M., Milošević, D., Tamindžić, G., & Ivanović, M. (2024). *Bacillus* species: Excellent biocontrol agents against tomato diseases. *Microorganisms*, *12*(3), 457. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030457>
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: A comprehensive review. *Journal of Natural Products*, *82*(7), 2038-2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., et al. (2020). MIBiG 2.0: A repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic Acids Research*, *48*, D454–D458. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz882>
- Ke, W. J., Hsueh, Y. H., Cheng, Y. C., Wu, C. C., & Liu, S. T. (2015). Water surface tension modulates the swarming mechanics of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01017>
- Khan, A., Doshi, H. V., & Thakur, M. C. (2016). *Bacillus* spp.: A prolific siderophore producer. In M. Islam, M. Rahman, P. Pandey, C. Jha, & A. Aeron (Eds.), *Bacilli and Agrobiotechnology* (pp. 13). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_13

- Howal, S., Siddiqui, M. Z., Ali, S., Khan, M. T., Khan, M. A., Naqvi, S. H., & Wajid, S. (2017). A report on extensive lateral genetic reciprocation between arsenic resistant *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains analyzed using RAPD-PCR. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *107*, 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.010>
- Kiefer, A., Tang, P., Arndt, S., Fallico, V., & Wong, C. (2020). Optimization of viability treatment essential for accurate droplet digital PCR enumeration of probiotics. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1811. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01811>
- Kim, M. H., Choi, W. C., Kang, H. O., Lee, J. S., Kang, B. S., Kim, K. J., Derewenda, Z. S., Oh, T. K., Lee, C. H., & Lee, J. K. (2005). The molecular structure and catalytic mechanism of a quorum-quenching N-acyl-L-homoserine lactone hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*, 17606–17611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504996102>
- Koehler, T. M. (2009). *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(6), 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.004>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
- Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth-promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, *167*(8), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>
- Kumar, P., Kamle, M., Borah, R., Mahato, D. K., & Sharma, B. (2021). *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: Uses and application for sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*(95). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00438-x>
- Kulkova, I., Dobrzyński, J., Kowalczyk, P., Bełżecki, G., & Kramkowski, K. (2023). Plant growth promotion using *Bacillus cereus*. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(11), 9759. <https://doi.org/10.3390/ijms24119759>
- Kurniawan, O., Wilson, K., Mohamed, R., & Avis, T. J. (2018). *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. *Biological Control*, *126*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.001>
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms*, *10*(3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Lanna Filho, R., de Souza, R. M., Ferreira, A., Quecine, M. C., Alves, E., & de Azevedo, J. L. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. *Australasian Plant Pathology*, *42*(5), 643–651. <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0233-z>

- Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., & Urdaci, M. C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulins: a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins produced by *Bacillus coagulans* I4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5213–5220. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5213-5220.2000>
- Lee, J., Kim, S., Jung, H., Koo, B. K., Han, J. A., & Lee, H. S. (2023). Exploiting bacterial genera as biocontrol agents: Mechanisms, interactions and applications in sustainable agriculture. *Journal of Plant Biology*, 66, 485–498. <https://doi.org/10.1007/s12374-023-09201-8>
- Legein, M., Smets, W., Vandenheuevel, D., Eilers, T., Muysshondt, B., Prinsen, E., et al. (2020). Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>
- Liang, N., Charron, J. B., & Jabaji, S. (2023). Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* E68 against *Fusarium graminearum* DAOMC 180378, the causal agent of *Fusarium* head blight. *PLOS ONE*, 18(1), e0277983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277983>
- Liu, J., Fu, K., Wang, Y., Wu, C., Li, F., Shi, L., Ge, Y., & Zhou, L. (2017). Detection of diverse N-acyl-homoserine lactones in *Vibrio alginolyticus* and regulation of biofilm formation by N-(3-oxodecanoyl) homoserine lactone in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01097>
- Liu, Y., Yang, X., Gan, J., Chen, S., Xiao, Z. X., & Cao, Y. (2022). CB-Dock2: Improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking, and homologous template fitting. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W159–W164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac394>
- Long, S. (2022). In pursuit of sensitivity: Lessons learned from viral nucleic acid detection and quantification on the Raindance ddPCR platform. *Methods*, 201, 82–95. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.008>
- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., & Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview of its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Lyng, M., & Kovács, Á. T. (2023). Frenemies of the soil: *Bacillus* and *Pseudomonas* interspecies interactions. *Trends in Microbiology*, 31(8), 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.02.003>
- Macůrková, A., Maryška, L., Jindřichová, B., Drobníková, T., Vrchotová, B., Pospíchalová, R., Záruba, K., Hubáček, T., Siegel, J., Burketová, L., & Lovecká, P. (2021). Effect of round-shaped silver nanoparticles on the genetic and functional diversity of soil microbial community in soil and “soil-plant” systems. *Applied Soil Ecology*, 168, 104165. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104165>
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock biology of microorganisms*. Global Edition, 15/E, Pearson.

- Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S., & Speert, D. P. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1129-1135. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1129-1135.1996>
- Maier, J., Lange, T., Cross, M., Wildenberger, K., Niederwieser, D., & Franke, G. N. (2019). Optimized digital droplet PCR for BCR-ABL. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 21(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.08.012>
- Maksimov, I. V., Singh, B. P., Cherepanova, E. A., Burkhanova, G. F., & Khairullin, R. M. (2020). Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56, 15–28. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010106>
- Malešević, M., Stanisavljević, N., Novović, K., Polović, N., Vasiljević, Z., Kojić, M., & Jovčić, B. (2020). *Burkholderia cepacia* YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit virulence of *Pseudomonas aeruginosa* via quorum quenching activity. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104561. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104561>
- Malviya, D., Sahu, P. K., Singh, U. B., Paul, S., Gupta, A., Gupta, A. R., Singh, S., Kumar, M., Paul, D., & Rai, J. P. (2020). Lesson from ecotoxicity: Revisiting the microbial lipopeptides for the management of emerging diseases for crop protection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1434. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041434>
- Mandel, M., & Higa, A. (1989). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2015). Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum*, 3(1), 10.1128/microbiolspec.tbs-0017-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0017-2013>
- Manfredini, A., Malusà, E., Costa, C., Pallottino, F., Mocali, S., Pinzari, F., & Canfora, L. (2021). Current methods, common practices, and perspectives in tracking and monitoring bioinoculants in soil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 698491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698491>
- Manzari, C., Oranger, A., Fosso, B., Piancone, E., Pesole, G., & D'Erchia, A. M. (2020). Accurate quantification of bacterial abundance in metagenomic DNAs accounting for variable DNA integrity levels. *Microbial Genomics*, 6(10), 1–10. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000417>
- Markelova, N., & Chumak, A. (2025). Antimicrobial activity of *Bacillus* cyclic lipopeptides and their role in the host adaptive response to changes in environmental conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1), 336. <https://doi.org/10.3390/ijms26010336>
- Marković, S., Milovanović, T. P., Jelušić, A., Iličić, R., Medić, O., Berić, T., & Stanković, S. (2023). Biological control of major pathogenic bacteria of potato by *Bacillus amyloliquefaciens* strains SS-12.6 and SS-38.4. *Biological Control*, 182. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105238>
- Maurer, K. A., Zachow, C., Seefelder, S., & Berg, G. (2013). Initial steps towards biocontrol in hops: Successful colonization and plant growth promotion by four bacterial biocontrol agents. *Agronomy*, 3(4), 583–594. <https://doi.org/10.3390/agronomy3040583>

- Meena, K. R., Sharma, A., Kumar, R., & Kanwar, S. S. (2018). Two-factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as an antifungal agent. *Journal of King Saud University – Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.025>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, *10*, 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- Mellidou, I., & Karamanoli, K. (2022). Unlocking PGPR-mediated abiotic stress tolerance: What lies beneath. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *6*, 832896. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.832896>
- Meng, Y., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Ye, R.-Q., & Mu, B.-Z. (2015). Quantification of lipopeptides using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization. *Analytical Sciences*, *31*(5), 377–382. <https://doi.org/10.2116/analsci.31.377>
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, *8*(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Milner, R. J. (1994). History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *49*(1), 9–13. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90037-X)
- Mishra, P., Mishra, J., Dwivedi, S. K., & Arora, N. K. (2020). Microbial enzymes in biocontrol of phytopathogens. In P. Mishra, J. Mishra, S. K. Dwivedi, & N. K. Arora (Eds.), *Microbial enzymes: Roles and applications in industries* (pp. 259–285). Springer. https://doi.org/10.1007/springer978-3-030-57237-3_15
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., & Défago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: A preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, *45*, 71–81. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00125-9)
- Molina-Favero, C., Creus, C. M., Lanteri, M. L., Correa-Aragunde, N., Lombardo, M. C., Barassi, C. A., & Lamattina, L. (2007). Nitric oxide and plant growth-promoting rhizobacteria: Common features influencing root growth and development. *Advances in Botanical Research*, *46*, 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(07\)46001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(07)46001-3)
- Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., Navarro, Y., Berlanga-Clavero, M. V., Caraballo-Rodriguez, A. M., Petras, D., García-Martín, M. L., Lamon, G., Habenstein, B., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Loquet, A., Dorrestein, P. C., & Romero, D. (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*, *10*(1), 1919. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09944-x>
- Monteil, C. L., Bardin, M., & Morris, C. E. (2014). Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. *ISME Journal*, *8*(11), 2290–2304. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.55>
- Morales-Soto, N., Anyan, M. E., Mattingly, A. E., Madukoma, C. S., Harvey, C. W., Alber, M., Déziel, E., Kearns, D. B., & Shrout, J. D. (2015). Preparation, imaging, and quantification of

- bacterial surface motility assays. *Journal of Visualized Experiments*, 7(98), 52338. <https://doi.org/10.3791/52338>
- Moreno-Velandia, C. A., Ongena, M., Kloepper, J. W., & Cotes, A. M. (2021). Biosynthesis of cyclic lipopeptides by *Bacillus velezensis* Bs006 and its antagonistic activity are modulated by the temperature and culture media conditions. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02612-8>
- Morohoshi, T., Oshima, A., Xie, X., & Someya, N. (2021). Genetic and functional diversity of PsyI/PsyR quorum-sensing system in the *Pseudomonas syringae* complex. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2), fiae254. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae254>
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., & Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal*, 2(3), 321–334. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.113>
- Müller, M. (2021). Foes or friends: ABA and ethylene interaction under abiotic stress. *Plants*, 10(3), 448. <https://doi.org/10.3390/plants10030448>
- Musthafa, K. S., Saroja, V., & Pandian, S. K. (2011). Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). *Journal of Biosciences*, 36, 55–67. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9011-7>
- Naga, N. G., El-Badan, D. E., Ghanem, K. M., & Shaaban, M. I. (2023). It is the time for quorum sensing inhibition as an alternative strategy of antimicrobial therapy. *Cell Communication and Signaling*, 21, Article 133. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01127-4>
- Nampijja, M., Derie, M., & du Toit, L. J. (2021). First report of bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on Swiss chard, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, in Arizona. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2554-PDN>
- Nannan, C., Vu, H. Q., Gillis, A., Caulier, S., Nguyen, T. T. T., & Mahillon, J. (2021). Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: Gene prevalence versus antagonistic activity against Gram-negative foodborne pathogens. *Journal of Biotechnology*, 327, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.017>
- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4, 139. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>
- Nihorimbere, G., Korangi Alleluya, V., Nimbeshaho, F., Nihorimbere, V., Legrève, A., & Ongena, M. (2024). *Bacillus*-based biocontrol beyond chemical control in central Africa: The challenge of turning myth into reality. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1349357. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1349357>
- Nikolić, I. (2018). Identifikacija, genetički diverzitet i biološka kontrola *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* sa područja Srbije *Doktorska disertacija*, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Nikolić, I., Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D., & Stanković, S. (2019). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and

Bacillus amyloliquefaciens (SS-12.6 and SS-38.4) strains. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 165–176. <https://doi.org/10.1111/jam.14070>

Noor, A. O., Almasri, D. M., Basyony, A. F., Albohy, A., Almutairi, L. S., Alhammadi, S. S., Alkhamisi, M. A., Alsharif, S. A., & Elfaky, M. A. (2022). Biodiversity of N-acyl homoserine lactonase (aiiA) gene from *Bacillus subtilis*. *Microbial Pathogenesis*, 166, 105543. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105543>

Ntushelo, K., Ledwaba, L. K., Rauwane, M. E., Adebo, O. A., & Njobeh, P. B. (2019). The mode of action of *Bacillus* species against *Fusarium graminearum*, tools for investigation, and future prospects. *Toxins*, 11(10), 606. <https://doi.org/10.3390/toxins11100606>

Oliveira, S. S., Seldin, L., & Bastos, M. C. (1993). Identification of structural nitrogen-fixation (*nif*) genes in *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(3), 387–389. <https://doi.org/10.1007/BF00383088>

Orce, I. G., Martínez, F. L., Aparicio, M., Torres, M. J., Rajal, V. B., & Irazusta, V. P. (2021). Genetic fingerprint and diversity evaluation of halophilic *Bacillus* species by RAPD-PCR. *An Acad Bras Cienc*, 93, 1–8. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191430>

Pacocho, N., Scheler, O., Nowak, M. M., Derzsi, L., Cichy, J., & Garstecki, P. (2019). Direct droplet digital PCR (dddPCR) for species-specific, accurate, and precise quantification of bacteria in mixed samples. *Analytical Methods*, 11(44), 5685–5693. <https://doi.org/10.1039/C9AY01889C>

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>

Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>

Patani, A., Patel, M., Islam, S., Yadav, V. K., Prajapati, D., Yadav, A. N., Sahoo, D. K., & Patel, A. (2024). Recent advances in *Bacillus*-mediated plant growth enhancement: A paradigm shift in redefining crop resilience. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40, Article 77. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03903-5>

Picard, M., Wood, S. A., Pochon, X., Vandergoes, M. J., Reyes, L., Howarth, J. D., Hawes, I., & Puddick, J. (2022). Molecular and pigment analyses provide comparative results when reconstructing historic cyanobacterial abundances from lake sediment cores. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020279>

Poveda, J., & González-Andrés, F. (2021). *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23), 8629–8645. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>

Radhakrishnan, R., & Lee, I. J. (2016). Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>

Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2017). *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, 8, 667. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>

Rai, R. K., Singh, V. P., & Upadhyay, A. (2017). Chapter 10 - Irrigation methods. In *Planning and evaluation of irrigation projects: Methods and implementation* (pp. 353–363). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811748-4.00010-8>

Ramalakshmi, A., Sharmila, R., Iniyakumar, M., & Gomathi, V. (2020). Nematicidal activity of native *Bacillus thuringiensis* against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(90). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00271-y>

Ramírez-Pool, J. A., Calderón-Pérez, B., Ruiz-Medrano, R., Ortiz-Castro, R., & Xoconostle-Cazares, B. (2024). *Bacillus* strains as effective biocontrol agents against phytopathogenic bacteria and promoters of plant growth. *Microbial Ecology*, 87, Article 76. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02384-1>

Rangel-Montoya, E. A., Delgado-Ramírez, C. S., Sepulveda, E., & Hernández-Martínez, R. (2022). Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* using *Bacillus amyloliquefaciens* strains in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Agronomy*, 12(3), 676. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030676>

Ranković, T., Nikolić, I., Berić, T., Popović, T., Lozo, J., Medić, O., & Stanković, S. (2023). Genome analysis of two *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* strains with different virulence capacity isolated from sugar beet: Features of successful pathogenicity in the phyllosphere microbiome. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e0359822. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03598-22>

Rawat, P., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2022). Synergistic impact of phosphate solubilizing bacteria and phosphorus rates on growth, antioxidative defense system, and yield characteristics of upland rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 41, 2449–2461. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10458-4>

Raza, W., Ling, N., Yang, L., Huang, Q., & Shen, Q. (2016). Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Scientific Reports*, 6, 24856. <https://doi.org/10.1038/srep24856>

ReddyPriya, P., Soumare, A., & Balachandar, D. (2019). Multiplex and quantitative PCR targeting SCAR markers for strain-level detection and quantification of biofertilizers. *Journal of General Microbiology*, 59, 111–119. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800318>

Reina, J. C., Pérez-Victoria, I., Martín, J., & Llamas, L. A. (2019). Quorum-sensing inhibitor strain of *Vibrio alginolyticus* blocks QS-controlled phenotypes in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Drugs*, 17, 494. <https://doi.org/10.3390/md17090494>

Republički hidrometeorološki zavod. (n.d.). *Meteorologija*. Preuzeto 17. januara 2025. sa https://www.hidmet.gov.rs/eng/meteorologija/uslovi_vlaznosti.php

Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785>

Romano, I., Ventrino, V., & Pepe, O. (2020). Effectiveness of plant beneficial microbes: Overview of the methodological approaches for the assessment of root colonization and persistence. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00006>

- Romasi, E. F., & Lee, J. (2013). Development of indole-3-acetic acid-producing *Escherichia coli* by functional expression of *IpdC*, *AspC*, and *Iad1*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1726-36. <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08082>
- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 10), 2429-2436. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009126-0>
- Rosić, I., Nikolić, I., Ranković, T., Anteljević, M., Medić, O., Berić, T., & Stanković, S. (2023). Genotyping-driven diversity assessment of biocontrol potent *Bacillus* spp. strain collection as a potential method for the development of strain-specific biomarkers. *Archives of Microbiology*, 205(4), 114. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03460-9>
- Rosić, I., Nikolić, I., Anteljević, M., Marić, I., Ranković, T., Stanković, S., Berić, T., Medić, O. (2025a) Diversity and activity of AHL-lactonases in *Bacillus* spp. from various environments. *FEMS Microbiology Letters*, fnaf038. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaf038>
- Rosić, I., Nikolić, I., Anteljević, M., Đorđević, S., Berić, T., Stanković, S., Medić, O. (2025b). Soil-dwelling *Bacillus velezensis* SS-38.4 efficiently colonizes sugar beet phyllosphere and controls phytopathogenic *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology Research*. <https://doi.org/10.1186/s42483-025-00346-0>
- Roskova, Z., Skarohlid, R., & McGachy, L. (2022). Siderophores: An alternative bioremediation strategy? *Science of the Total Environment*, 819, 153144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144>
- Rotondo, F., Vrisman, C. M., Rani, R., Testen, A. L., Deblais, L., & Miller, S. A. (2020). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial leaf spot on common beet (*Beta vulgaris*) in Ohio. *Plant Disease*, 104(2), 561. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1720-PDN>
- Rückert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O., & Borriss, R. (2011). Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7(T) reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Biotechnology*, 20(1), 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.006>
- Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091>
- Sagar, A., Rai, S., Sharma, S., Perveen, K., Bukhari, N. A., Sayyed, R. Z., & Mastinu, A. (2024). Molecular characterization reveals biodiversity and biopotential of rhizobacterial isolates of *Bacillus* spp. *Microbial Ecology*, 87, Article 83. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02397-w>
- Samaniego-Gámez, B. Y., Valle-Gough, R. E., Garruña-Hernández, R., Reyes-Ramírez, A., Latournerie-Moreno, L., Tun-Suárez, J. M., et al. (2023). Induced systemic resistance in the *Bacillus* spp.-*Capsicum chinense* Jacq.-PepGMV interaction, elicited by defense-related gene expression. *Plants*, 12(11), 2069. <https://doi.org/10.3390/plants12112069>
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2012). Genetically modified *Bacillus thuringiensis* biopesticides. In E. Sansinenea (Ed.), *Bacillus thuringiensis biotechnology* (pp. 231–258). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_13

- Santos-Lima, D., de Castro Spadari, C., de Morais Barroso, V., Carvalho, J. C. S., de Almeida, L. C., Alcalde, F. S. C., Ferreira, M. J. P., Sannomiya, M., & Ishida, K. (2023). Lipopeptides from an isolate of *Bacillus subtilis* complex have inhibitory and antibiofilm effects on *Fusarium solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(19), 6103–6120. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12712-z>
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Science and Technology*, *22*(8), 855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Schaffner, U., Heimpel, G. E., Mills, N. J., Muriithi, B. W., Thomas, M. B., Gc, Y. D., & Wyckhuys, K. A. G. (2024). Biological control for One Health. *Science of the Total Environment*, *951*, 175800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175800>
- Scheler, O., Pacocha, N., Debski, P. R., Ruszczak, A., Kaminski, T. S., & Garstecki, P. (2017). Optimized droplet digital CFU assay (ddCFU) provides precise quantification of bacteria over a dynamic range of 6 logs and beyond. *Lab on a Chip*, *17*(11), 1980–1987. <https://doi.org/10.1039/C7LC00206H>
- Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., & Jackson, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, *94*(11), 1267–1271. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1267>
- Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., & Dietel, K. (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.01474-14>
- Schwenk, V., Dietrich, R., Klingl, A., Märtlbauer, E., & Jessberger, N. (2022). Characterization of strain-specific *Bacillus cereus* swimming motility and flagella by means of specific antibodies. *PLOS ONE*, *17*(3), e0265425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265425>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, *160*(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sehrawat, A., Sindhu, S. S., & Glick, B. R. (2022). Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, *32*(1), 15–38. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9)
- Serrão, C. P., Ortega, J. C. G., Rodrigues, P. C., & de Souza, C. R. B. (2024). *Bacillus* species as tools for biocontrol of plant diseases: A meta-analysis of twenty-two years of research, 2000-2021. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *40*(4), 110. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03935-x>
- Shahid, I., Han, J., Hanoq, S., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. (2021). Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*, 605195. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.605195>
- Shahid, M., Singh, U. B., Khan, M. S., Singh, P., Kumar, R., Singh, R. N., Kumar, A., & Singh, H. V. (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and

- potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1132770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132770>
- Sharma, A., Singh, R. K., Singh, P., Vaishnav, A., Guo, D.-J., Verma, K. K., Li, D.-P., Song, X.-P., Malviya, M. K., Khan, N., Lakshmanan, P., & Li, Y.-R. (2021). Insights into the bacterial and nitric oxide-induced salt tolerance in sugarcane and their growth-promoting abilities. *Microorganisms*, *9*(11), 2203. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112203>
- Slepecky, R. A., & Hemphill, H. E. (2006). The genus *Bacillus*—Nonmedical. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_16
- Solis-Balandra, M. A., & Sanchez-Salas, J. L. (2024). Classification and multi-functional use of bacteriocins in health, biotechnology, and food industry. *Antibiotics*, *13*(7), 666. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070666>
- Soni, R., & Keharia, H. (2021). Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming *Bacilli*. *Planta*, *254*(3), 49. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03695-0>
- Sorokan, A., Gabdrakhmanova, V., Kuramshina, Z., Khairullin, R., & Maksimov, I. (2023). Plant-associated *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*: Inside agents for biocontrol and genetic recombination in phytomicrobiome. *Plants*, *12*(23), 4037. <https://doi.org/10.3390/plants12234037>
- Stanković, S. (2003). *Identifikacija introna kod Bacillus sp. izolovanih iz prirodnih staništa* (Doctoral dissertation, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu).
- Stanković, S., Mihajlović, S., Draganić, V., Dimkić, I., Vukotić, G., Berić, T., & Fira, Đ. (2012). Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. *Archives of Biological Sciences*, *64*(4), 1425–1432. <https://doi.org/10.2298/ABS1204425S>
- Stefańska, I., Kwiecień, E., Górczyńska, M., Sałamaszyńska-Guz, A., & Rzewuska, M. (2022). RAPD-PCR-based fingerprinting method as a tool for epidemiological analysis of *Trueperella pyogenes* infections. *Pathogens*, *11*(5), 562. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050562>
- Strauch, O., Strasser, H., Hauschild, R., & Ehlers, R. U. (2011). Proposals for bacterial and fungal biocontrol agents. In R. U. Ehlers (Ed.), *Regulation of Biological Control Agents* (pp. 13–45). Springer. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3664-3_13
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R. R., & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, *94*(3), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- Stojšin, V., Balaž, J., Budakov, D., Stanković, S., Nikolić, I., Ivanović, Ž., & Popović, T. (2015). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial leaf spot on sugar beet in Serbia. *Plant Disease*, *99*(2), 281. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0628-PDN>
- Stülke, J., Gruppen, A., Bramkamp, M., & Pelzer, S. (2023). *Bacillus subtilis*, a Swiss Army Knife in science and biotechnology. *Journal of Bacteriology*, *205*, e00102-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00102-23>

- Sun, J., He, X., Le, Y., Al-Tohamy, R., & Ali, S. S. (2024). Potential applications of extremophilic bacteria in the bioremediation of extreme environments contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 352, 120081. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120081>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tarkowski, P., & Vereecke, D. (2014). Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*, 32(1), 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.001>
- Tian, Z., Chen, Y., Chen, S., Yan, D., Wang, X., & Guo, Y. (2022). *AcdS* gene of *Bacillus cereus* enhances salt tolerance of seedlings in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1), 902–913. <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2144450>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2024). How do plant growth-promoting bacteria use plant hormones to regulate stress reactions? *Plants*, 13(17), 2371. <https://doi.org/10.3390/plants1317237>
- Tiwari, S., Prasad, V., & Lata, C. (2019). *Bacillus*: Plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture and environment. In S. Das, N. Dash, & P. C. Mishra (Eds.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Microbial biotechnology in agro-environmental sustainability* (pp. 43–55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00003-1>
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2020). Crop protection against *Botrytis cinerea* by rhizosphere biological control agent *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms*, 8(7), 992. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8070992>
- Turnau, K., Fiałkowska, E., Ważny, R., Rozpądek, P., Tylko, G., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Grabski, M., Węgrzyn, A., & Węgrzyn, G. (2021). Extraordinary multi-organismal interactions involving bacteriophages, bacteria, fungi, and rotifers: Quadruple microbial trophic network in water droplets. *International Journal of Molecular Science*, 22(4), 2178. <https://doi.org/10.3390/ijms22042178>
- van den Bosch, R., Messenger, P. S., & Gutierrez, A. P. (1982). The history and development of biological control. In *An introduction to biological control* (pp. 21–36). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9162-4_3
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Upadhyay, H., Gangola, S., Sharma, A., Singh, A., Maithani, D., & Joshi, S. (2021). Contribution of zinc solubilizing bacterial isolates on enhanced zinc uptake and growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Folia Microbiologica*, 66(4), 543–553. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00863-3>
- van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: A user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>

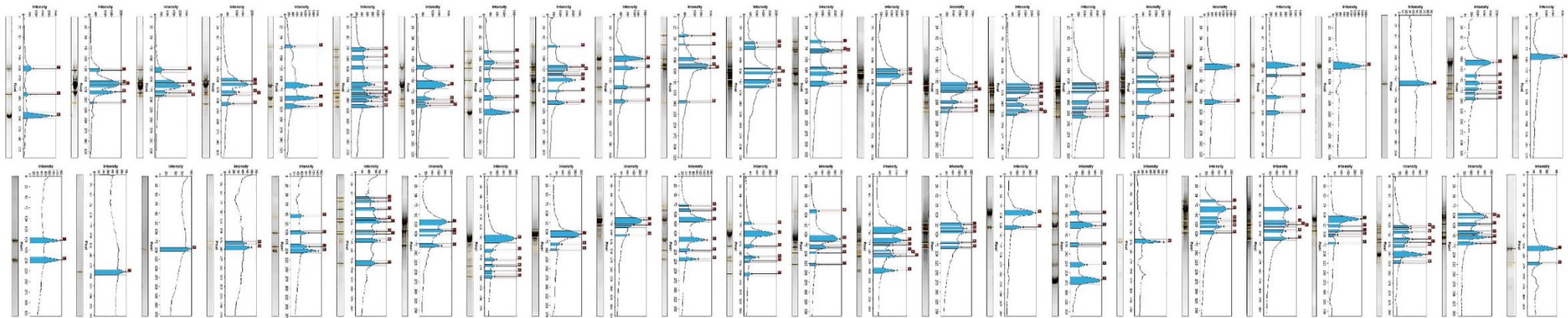
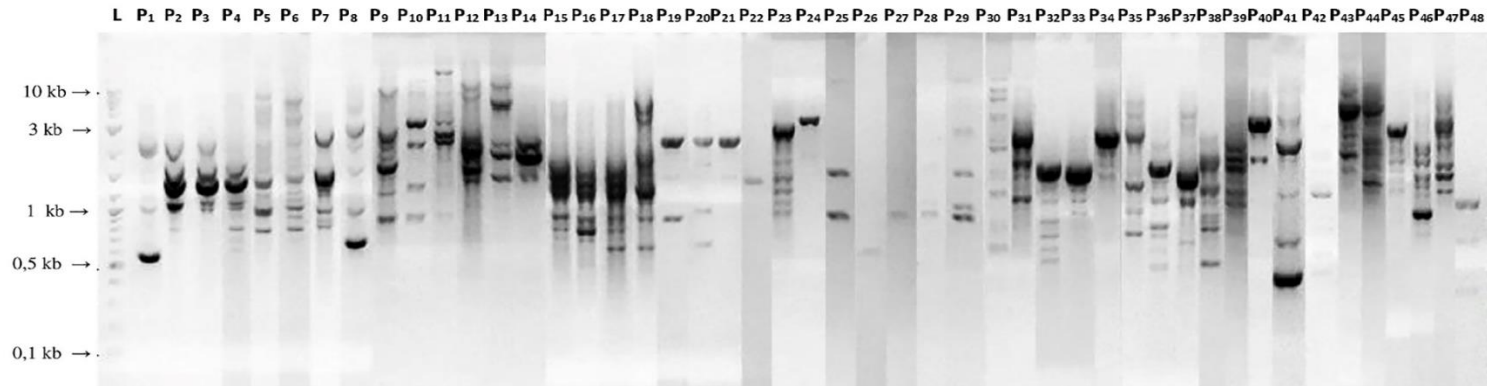
- Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research*, 27(5), 737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>
- Vasques, N. C., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2024). Increasing application of multifunctional *Bacillus* for biocontrol of pests and diseases and plant growth promotion: Lessons from Brazil. *Agronomy*, 14(8), 1654. <https://doi.org/10.3390/agronomy14081654>
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Versalovic, J., de Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1998). Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In F. J. de Bruijn, J. R. Lupski, & G. M. Weinstock (Eds.), *Bacterial Genomes* (pp. 34). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3_34
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95–110. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Vishwakarma, S. K., Ilyas, T., Shahid, M., Malviya, D., Kumar, S., Singh, S., Johri, P., Singh, U. B., & Singh, H. V. (2024). *Bacillus* spp.: Nature's gift to agriculture and humankind. In V. Mageshwaran, U. B. Singh, A. K. Saxena, & H. B. Singh (Eds.), *Applications of Bacillus and Bacillus derived genera in agriculture, biotechnology and beyond* (pp. 1–36). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-99-8195-3_1
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: Potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, e7258. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>
- Wang, M. S. W. (2009). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16S rDNA sequences. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3), 505–521. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090003000013>
- Wang, X. Q., Zhao, D. L., Shen, L. L., Jing, C. L., & Zhang, C. S. (2018). Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. In K. R. Hakeem & M. Sabir (Eds.), *Role of rhizospheric microbes in soil* (pp. 225–250). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96845-2_10
- Wang, W. Y., Kong, W. L., Liao, Y. C., & Zhu, L. H. (2022). Identification of *Bacillus velezensis* SBB and its antifungal effects against *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi*, 8(10), 1021. <https://doi.org/10.3390/jof8101021>
- Wang, C., Duan, T., Shi, L., Zhang, X., Fan, W., Wang, M., Wang, J., Ren, L., Zhao, X., & Wang, Y. (2022). Characterization of volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* YJ15 and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 106(9), 2321–2329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-22-0230-RE>
- Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lu, S., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., &

- Marchler-Bauer, A. (2023). The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*, D384-D388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, F. T. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*, W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Watry, H. L., Feliciano, C. M., Gjoni, K., Takahashi, G., Miyaoka, Y., Conklin, B. R., & Judge, L. M. (2020). Rapid, precise quantification of large DNA excisions and inversions by ddPCR. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71742-z>
- Wei, X., Moreno-Hagelsieb, G., Glick, B. R., & Doxey, A. C. (2023). Comparative analysis of adenylate isopentenyl transferase genes in plant growth-promoting bacteria and plant pathogenic bacteria. *Heliyon*, *9*(3), e13955. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13955>
- Weng, J., Wang, Y., Li, J., Shen, Q., & Zhang, R. (2013). Enhanced root colonization and biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by *abrB* gene disruption. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 8823–8830. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4572-4>
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, *18*, 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Wu, S., Liu, J., Liu, C., Yang, A., & Qiao, J. (2020). Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *77*, 1319–1343. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03326-8>
- Yan, Z. Z., Chen, Q. L., Li, C. Y., Nguyen, B. A. T., Zhu, Y. G., He, J. Z., & Hu, H. W. (2021). Biotic and abiotic factors distinctly drive contrasting biogeographic patterns between phyllosphere and soil resistomes in natural ecosystems. *ISME Communications*, *1*(1), Article 13. <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00012-4>
- Yáñez-Mendizabal, V., Viñas, I., Usall, J., Cañamás, T., & Teixidó, N. (2012). Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8. *Biotechnology Letters*, *34*(4), 729–735. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0834-y>
- Yi, H. S., Ahn, Y. R., Song, G. C., Ghim, S. Y., Lee, S., Lee, G., & Min Ryu, C. (2016). Impact of a bacterial volatile 2,3-butanediol on *Bacillus subtilis* rhizosphere robustness. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00993>
- Yousuf, J., Thajudeen, J., Rahiman, M., Krishnankutty, S., Alikunj, A. P., & Abdulla, M. H. A. (2017). Nitrogen-fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. *Journal of Basic Microbiology*, *57*(11), 922–932. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700072>

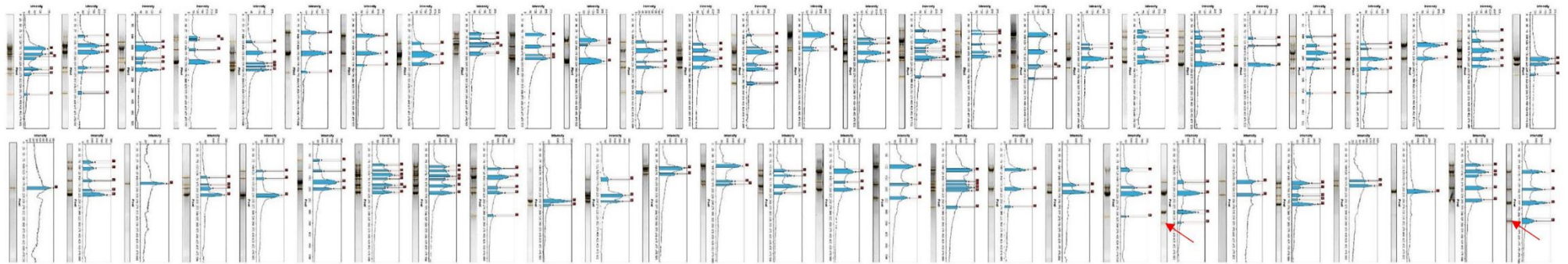
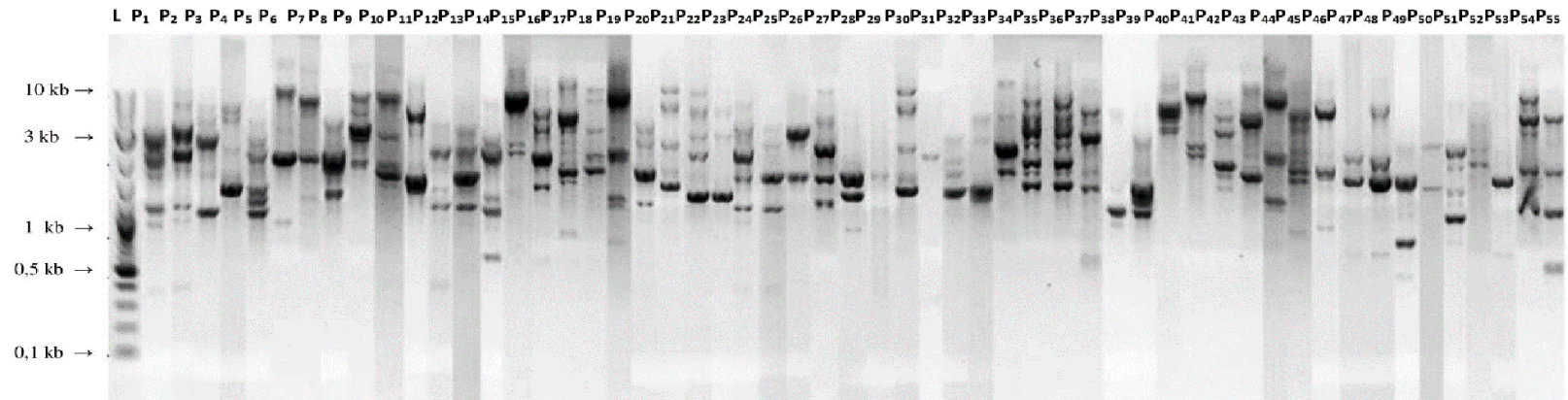
- Xie, S., Zang, H., Wu, H., Uddin Rajer, F., & Gao, X. (2018). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, 19(1), 49-58. <https://doi.org/10.1111/mpp.12494>
- Xie, S., Yu, H., Wang, Q., Cheng, Y., & Ding, T. (2020). Two rapid and sensitive methods based on TaqMan qPCR and droplet digital PCR assay for quantitative detection of *Bacillus subtilis* in rhizosphere. *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 518–527. <https://doi.org/10.1111/jam.14481>
- Xie, B., Wei, X., Wan, C., Zhao, W., Song, R., Xin, S., & Song, K. (2024). Exploring the biological pathways of siderophores and their multidisciplinary applications: A comprehensive review. *Molecules*, 29(10), 2318. <https://doi.org/10.3390/molecules29102318>
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>
- Xu, W., Yang, Q., Xie, X., Goodwin, P. H., Deng, X., Zhang, J., Sun, R., Wang, Q., Xia, M., Wu, C., & Yang, L. (2022). Genomic and phenotypic insights into the potential of *Bacillus subtilis* YB-15 isolated from rhizosphere to biocontrol against crown rot and promote growth of wheat. *Biology*, 11(5), 778. <https://doi.org/10.3390/biology11050778>
- Xu, X., & Kovács, Á. T. (2024). How to identify and quantify the members of the *Bacillus* genus? *Environmental Microbiology*, 26(2), e16593. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16593>
- Zhang, D., Luo, Y., Zeng, X., Yu, Y., & Wu, Y. (2022). Developing a multiplex PCR-based assay kit for bloodstream infection by analyzing genomic big data. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(10). <https://doi.org/10.1002/jcla.24686>
- Zhang, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., et al. (2023). Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: Improving the efficiency of green agriculture. *Microbial Biotechnology*, 16(12), 2250–2263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>
- Zhou, Q., Tu, M., Fu, X., Chen, Y., Wang, M., Fang, Y., Yan, Y., Cheng, G., Zhang, Y., Zhu, Z., Yin, K., Xiao, Y., Zou, L., & Chen, G. (2023). Antagonistic transcriptome profile reveals potential mechanisms of action on *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by *Bacillus velezensis* 504. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1175446. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1175446>
- Zhu, X., Chen, W. J., Bhatt, K., Zhou, Z., Huang, Y., Zhang, L. H., Chen, S., & Wang, J. (2023). Innovative microbial disease biocontrol strategies mediated by quorum quenching and their multifaceted applications: A review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1063393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1063393>
- Zubair, M., Hanif, A., Farzand, A., Sheikh, T. M. M., Khan, A. R., Suleman, M., Ayaz, M., & Gao, X. (2019). Genetic screening and expression analysis of psychrophilic *Bacillus* spp. reveal their potential to alleviate cold stress and modulate phytohormones in wheat. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090337>

8. PRILOZI

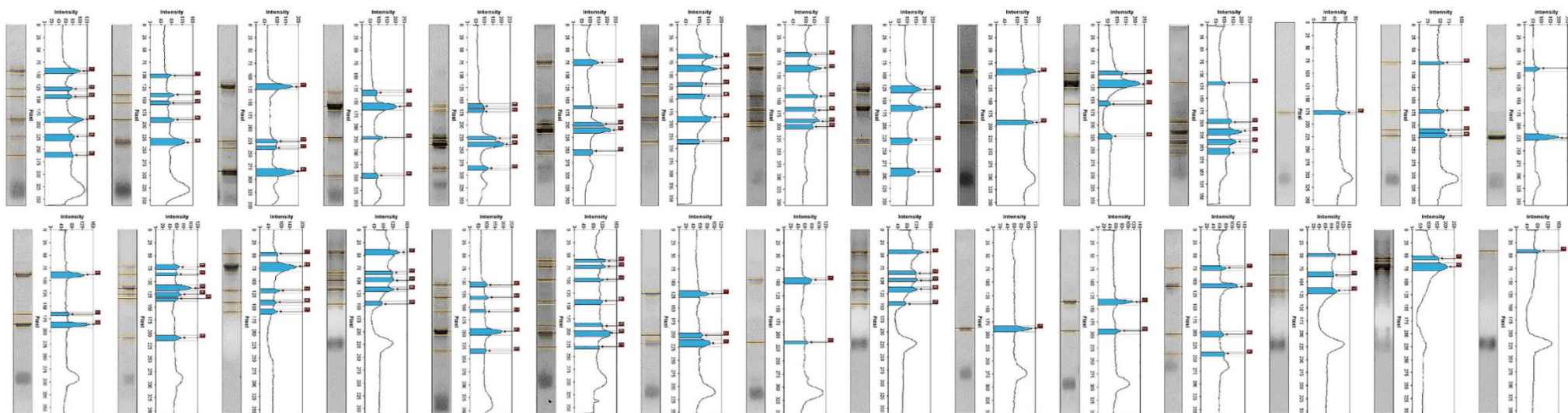
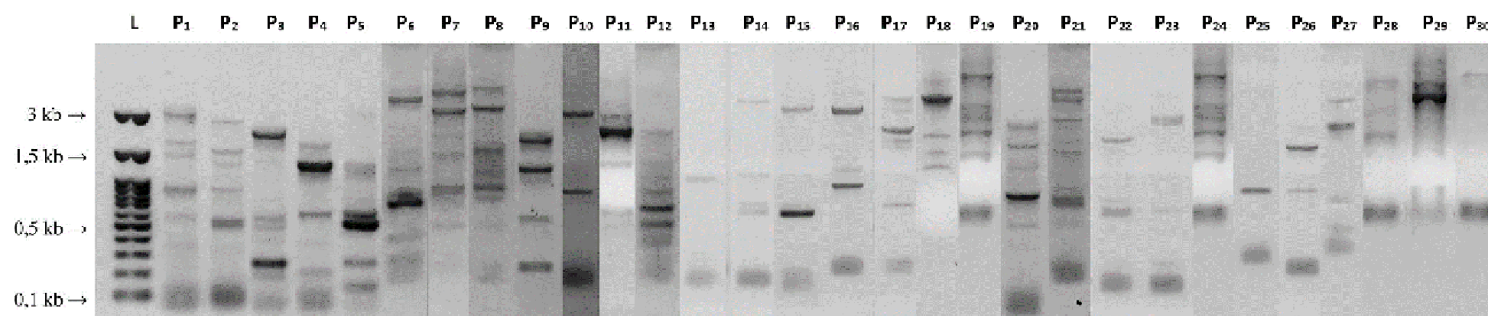
8. PRILOZI



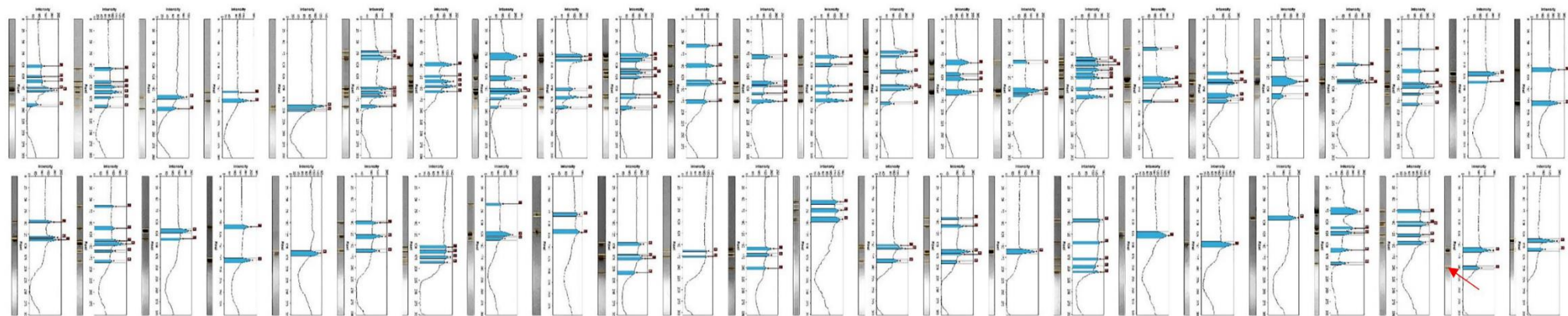
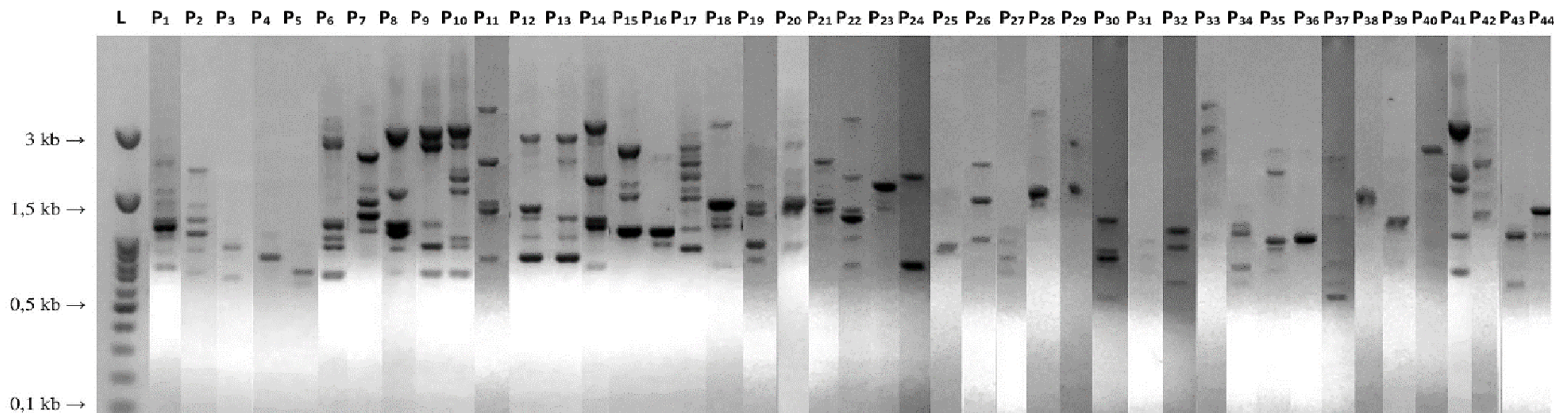
Prilog 1. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni rep-PCR metodom sa BOX-A1R prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 2.1.2; 2.1.3; **P2:** 2.3/2, 2.9.1, 2.9.2; **P3:** 2.6; **P4:** 2.12.1, 2.15, 3.1; **P5:** 1.1, 2.4, 3.2, 2.10.1, 2.10.2, 2.14, 3.1.2, 5.1.1, 5.1.3, 5.2; **P6:** 3.1.3, 4.1.1, 4.1.2, 5.1.2; **P7:** 2.5.1, 2.5.2; **P8:** 2.7, 2.8, 2.13.1, 2.13.2, 5.4; **P9:** 6.1, 6.1.2, 6.3, 6.4, 6.6.1, 8.1, 8.2, 8.2.1, 8.3, 8.4, 9.2; **P10:** 2.11, 6.5, 8.2.2, 10.3; **P11:** 9.1, 9.3, 9.4, 12.4; **P12:** 10.2, 10.4.1, 10.4.2, 10.6, 11.1; **P13:** 10.7, 10.8.1, 10.8.2, 11.2.1; **P14:** 10.5.1, 10.5.2; **P15:** 12.6.1, 12.6.2; **P16:** 8.1.2, 13.1, 15.4.2, 22.4, 36.3, 38.4.2; **P17:** 10.1, 14.3.1/1, 14.3.1/2, 14.4.2/1, 14.4.2/2, 16.1.2/1, 16.1.2/2, 18.1, 19.4, 20.3/1, 21.1/2, 27.2, 27.5/1, 30.3, 37.4, 38.1, 38.4.1, 40.3; **P18:** 6.2.3, 12.6.3, 12.7, 12.8, 12.9.1, 13.2, 13.3, 13.4.1, 13.4.2/1, 13.4.2/2, 14.3.2, 15.4.1, 16.1.1/1, 17.1, 18.4, 20.3/2, 20.4/1, 20.4/2, 21.1/1, 27.8/2, 29.4, 30.6.1, 32.7, 35.1/1, 36.5.1, 40.6/2, 50.4; **P19:** 16.2, 16.4, 18.2; **P20:** 14.6, 19.1; **P21:** 15.2, 17.3, 17.4, 20.1, 33.1; **P22:** 19.2, 19.3; **P23:** 21.4, 26.1, 26.5; **P24:** 21.5/1, 23.4; **P25:** 22.3, 23.3.1, 24.1, 36.4, 37.1, 37.1(II), 39.3; **P26:** 32.1, 32.5; **P27:** 35.6, 35.8, 36.2; **P28:** 27.7, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 34.1, 34.4, 34.5, 34.7, 36.1, 36.6/1, 37.2/1, 37.2/2, 37.3, 37.6, 40.1; **P29:** 34.2, 34.3, 35.1/2, 35.2, 35.5, 35.7, 37.7; **P30:** 23.3.2, 26.4, 27.1, 27.4, 27.6, 22.5.2; **P31:** 18.3, 21.3, 21.7, 26.9.1, 27.3; **P32:** 27.6/1, 27.8/1, 28.3, 29.6, 30.1; **P33:** 30.7/1, 30.7/2, 30.2, 30.5, 40.6/1; **P34:** 11.4, 12.1, 12.2/1, 12.2/2; **P35:** 27.6/2, 27.9, 28.1, 22.1/, 22.1/2; **P36:** 28.4, 28.6, 29.1, 29.5, 30.4; **P37:** 28.2/1, 28.2/2, 29.2, 29.3, 29.7; **P38:** 50.2/1, 50.2/2; **P39:** 11.3.1, 11.3.2, 12.5, 26.9.2, 26.10/1, 16.10/2; **P40:** 11.2.2, 12.3, 12.9.2, 22.2, 23.2; **P41:** 7.1.1, 7.1.2; **P42:** 2.3/1, 2.12.2; **P43:** 26.3, 26.7; **P44:** 26.8, 27.5/2; **P45:** 35.4/2, 40.5; **P46:** 28.5; **P47:** 37.5; **P48:** 40.2.



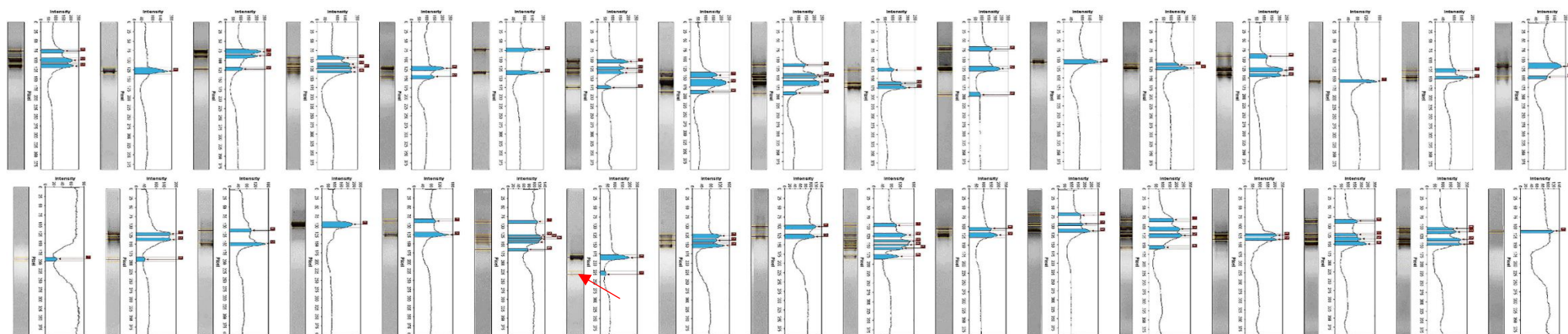
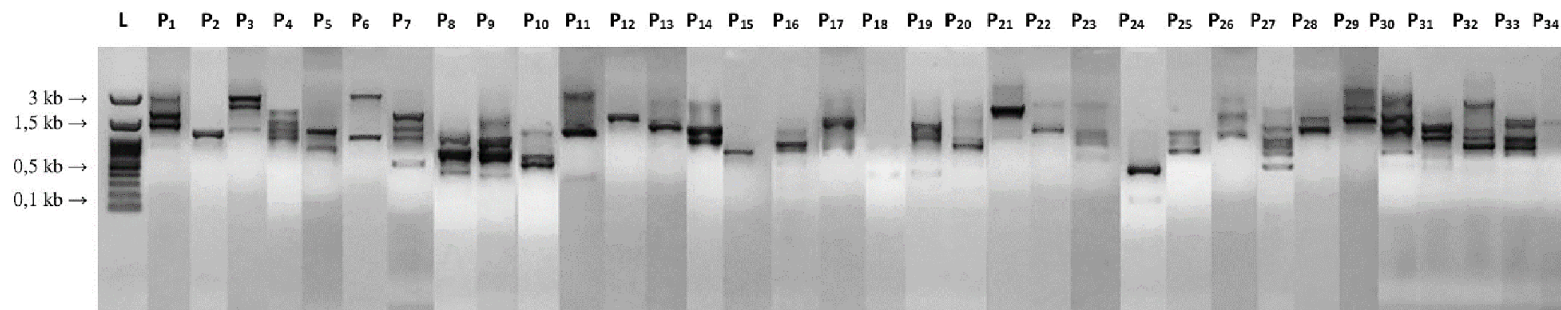
Prilog 2. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni rep-PCR metodom sa (GTG)₅ prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Crvenim strelicama na slici su obeležene jedinstvene trake, a žuto su označeni jedinstveni profili. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.11, 8.2.2, 10.8.1, 10.8.2; **P2:** 12.9.1, 14.6, 15.2, 19.1; **P3:** 2.4, 2.10.1, 2.10.2, 2.14, 3.1.2, 3.1.3, 3.2, 4.1.1, 4.1.2, 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3, 8.1.2; **P4:** 30.1, 30.2, 30.7/1, 30.7/2; **P5:** 2.6, 2.12.2, 2.15, 3.1; **P6:** 6.4, 6.6.1, 8.1, 8.1.1, 8.2, 8.3, 8.4, 9.4, 11.2.2, 11.3.1, 11.3.2, 18.4, 19.4, 26.4, 10.7; **P7:** 11.1, 26.8; **P8:** 2.13.1, 2.13.2; **P9:** 7.1.1, 7.1.2; **P10:** 10.6, 12.1, 12.2/1, 12.2/2; **P11:** 12.6.1, 12.6.2, 12.6.3, 12.7, 12.8, 12.9.2, 13.1, 13.2, 13.3, 13.4.1, 13.4.2/1, 13.4.2/2, 14.3.1/1, 14.3.1/2, 14.3.2, 14.4.2/1, 14.4.2/2, 15.4.2, 16.1.1/1, 16.1.2/1, 16.1.2/2, 16.2, 17.3, 18.2, 20.3/1, 20.3/2, 20.4/1, 20.4/2, 21.1/1, 21.1/2, 21.4, 26.10*/1, 26.10*/2, 29.4, 30.3, 30.6.1, 32.7; **P12:** 15.4.1, 16.4, 17.1, 17.4, 18.1, 18.3, 29.2; **P13:** 2.3/1, 5.2, 19.2, 19.3, 20.1; **P14:** 2.3/2, 2.8, 27.9; **P15:** 11.4, 21.3, 21.7, 26.9.1, 26.9.2, 27.3, 28.2/1, 28.2/2, 29.3, 29.7, 36.5/2; **P16:** 12.3, 32.8, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 34.1, 34.2, 34.3, 34.4, 35.1/2, 35.2, 35.3, 35.5, 35.6, 35.7, 35.8, 36.2, 36.4, 36.6/1, 36.6/2, 37.2/1, 37.2/2, 37.3, 37.4, 37.6, 37.7, 39.3, 40.1, 40.2, 40.6/1; **P17:** 22.1/1, 22.1/2; **P18:** 21.5/1, 23.2, 23.4; **P19:** 2.5.1, 2.5.2; **P20:** 2.9.1, 2.9.2; **P21:** 6.5, 10.3; **P22:** 10.4.1, 10.4.2; **P23:** 10.5.1, 10.5.2; **P24:** 38.4.1, 11.2.1; **P25:** 12.4, 12.5; **P26:** 20.2, 27.1; **P27:** 22.3, 22.5.1, 23.3.1; **P28:** 22.2, 22.5.2, 36.3; **P29:** 26.1, 26.3, 26.5; **P30:** 10.2, 27.2, 27.5/1, 27.8/2; **P31:** 27.6, 27.6/1, 27.6/2; **P32:** 26.7, 27.5/2, 27.8/1, 28.3, 28.4, 29.5; **P33:** 29.6, 30.5; **P34:** 28.6, 29.1; **P35:** 2.7, 27.4, 27.7, 28.1, 30.4; **P36:** 31.2, 31.3, 32.3, 32.4, 32.5; **P37:** 31.1, 33.1; **P38:** 32.1, 34.5, 34.7, 35.1/1, 35.4/1, 36.1, 36.5/1, 37.1, 37.1(II); **P39:** 37.5, 38.1, 38.2; **P40:** 10.1, 21.6, 39.1, 39.2, 40.3, 40.6/2; **P41:** 40.5, 50.4; **P42:** 8.2.1, 22.4; **P43:** 5.3, 5.4; **P44:** 6.1.2, 6.2.3, 6.3; **P45:** 23.3.2, 24.1; **P46:** 6.1, 9.2; **P47:** 2.12.1; **P48:** 28.5; **P49:** 32.6; **P50:** 35.4/2; **P51:** 38.4.2; **P52:** 50.2/1; **P53:** 50.2/2; **P54:** 9.1; **P55:** 9.3.



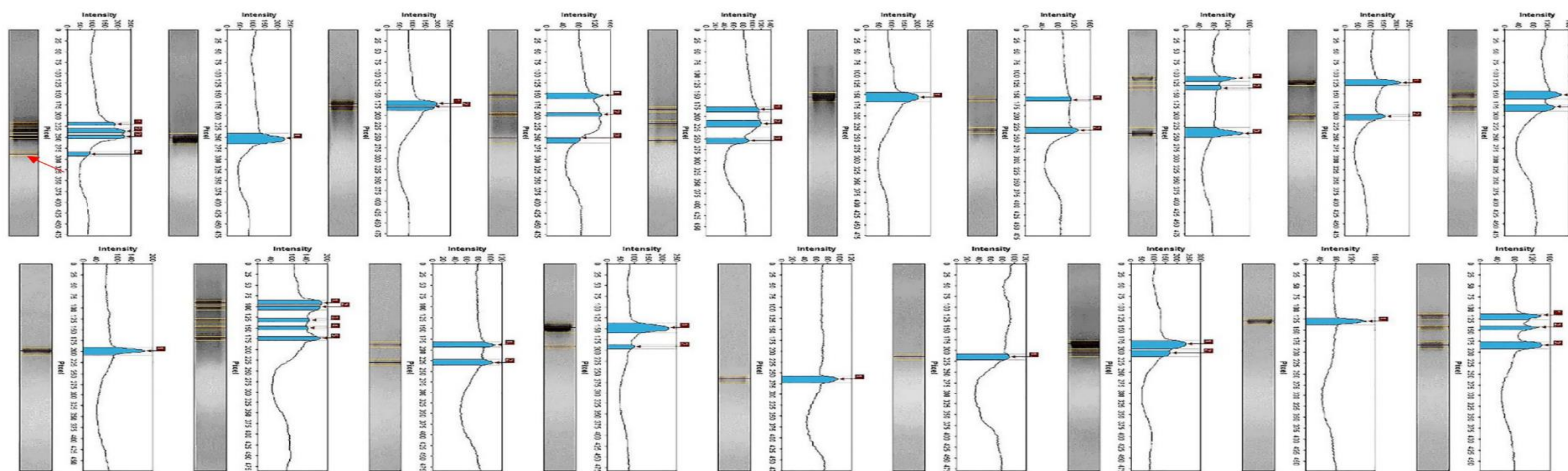
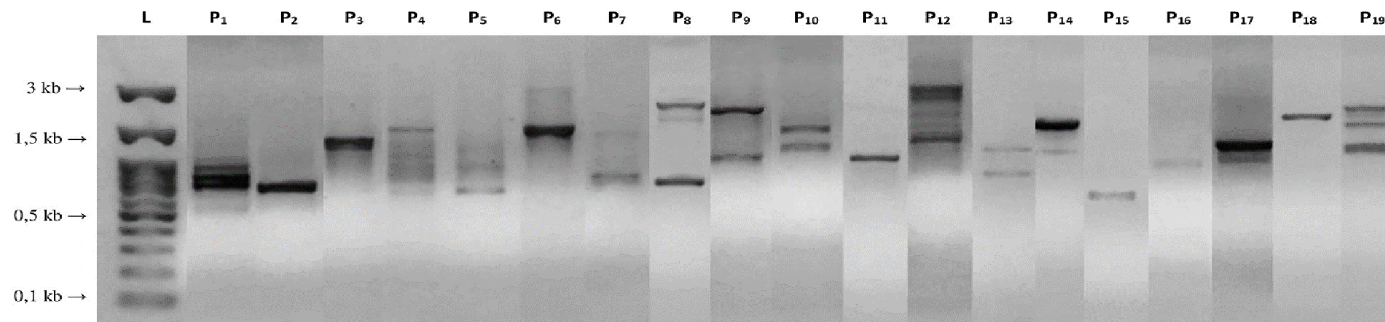
Prilog 3. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni rep-PCR metodom sa ERIC-1R i ERIC-2 prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.11, 8.2.2, 11.2.2; **P2:** 2.3/1, 2.8, 35.1/1; **P3:** 2.3/2, 2.9.1, 2.9.2, 2.12.2, 2.6; **P4:** 2.4, 2.14, 2.10/1, 2.10/2, 3.2, 3.1.2; **P5:** 2.7, 2.13.1, 2.13.2; **P6:** 10.7, 12.1, 12.2/1, 12.2/2, 11.2.1; **P7:** 6.6.1, 6.4, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 11.3.1, 11.3.2, 11.4; **P8:** 12.6.1, 12.6.2, 12.7, 12.8, 12.6.3, 12.9.1, 13.2, 14.3.1/1, 16.1.2/1, 15.4.1, 38.4.1, 38.4.2; **P9:** 2.15, 3.1; **P10:** 15.4.2, 16.1.1/1, 17.1, 18.1, 18.2, 26.9.2, 14.3.2, 18.3, 28.2/1, 28.2/2, 29.7, 29.3, 29.4, 30.6.1, 32.7; **P11:** 12.9.2, 13.1, 40.3; **P12:** 9.1, 9.3, 14.6; **P13:** 16.2, 16.4, 17.3, 17.4, 23.2, 37.1, 37.1(II), 23.4, 32.1, 34.5, 34.7, 15.2, 31.1, 36.1, 27.1, 32.5; **P14:** 26.1, 26.5, 27.6/1, 27.8/1, 28.3, 29.6, 30.1, 30.2, 30.7/1, 30.7/2, 40.5, 30.3, 30.5; **P15:** 27.6/2, 28.1, 30.4; **P16:** 36.5/1, 36.5/2; **P17:** 27.2, 27.5/1, 32.6, 38.1, 35.4/1, 37.5, 26.8; **P18:** 10.4.1, 10.4.2, 11.1, 26.10/1, 26.10/2, 50.2/2, 5.4, 8.1.1, 6.1, 6.1.2, 9.2, 9.4, 10.1, 10.2, 6.3, 6.2.3; **P19:** 10.8.1, 10.8.2, 26.4, 10.6, 26.3, 5.2, 7.1.1, 7.1.2; **P20:** 2.12.1; **P21:** 12.4; **P22:** 27.8/2; **P23:** 27.9; **P24:** 22.5.2, 8.2.1, 27.4; **P25:** 36.3; **P26:** 40.1; **P27:** 10.3, 6.5; **P28:** 10.5.1, 10.5.2, 2.5.1, 2.5.2, 3.1.3, 5.1.2, 4.1.1, 4.1.2, 5.1.1, 5.1.3, 5.3, 8.1.2; **P29:** 23.3.2, 38.2; **P30:** 26.7.



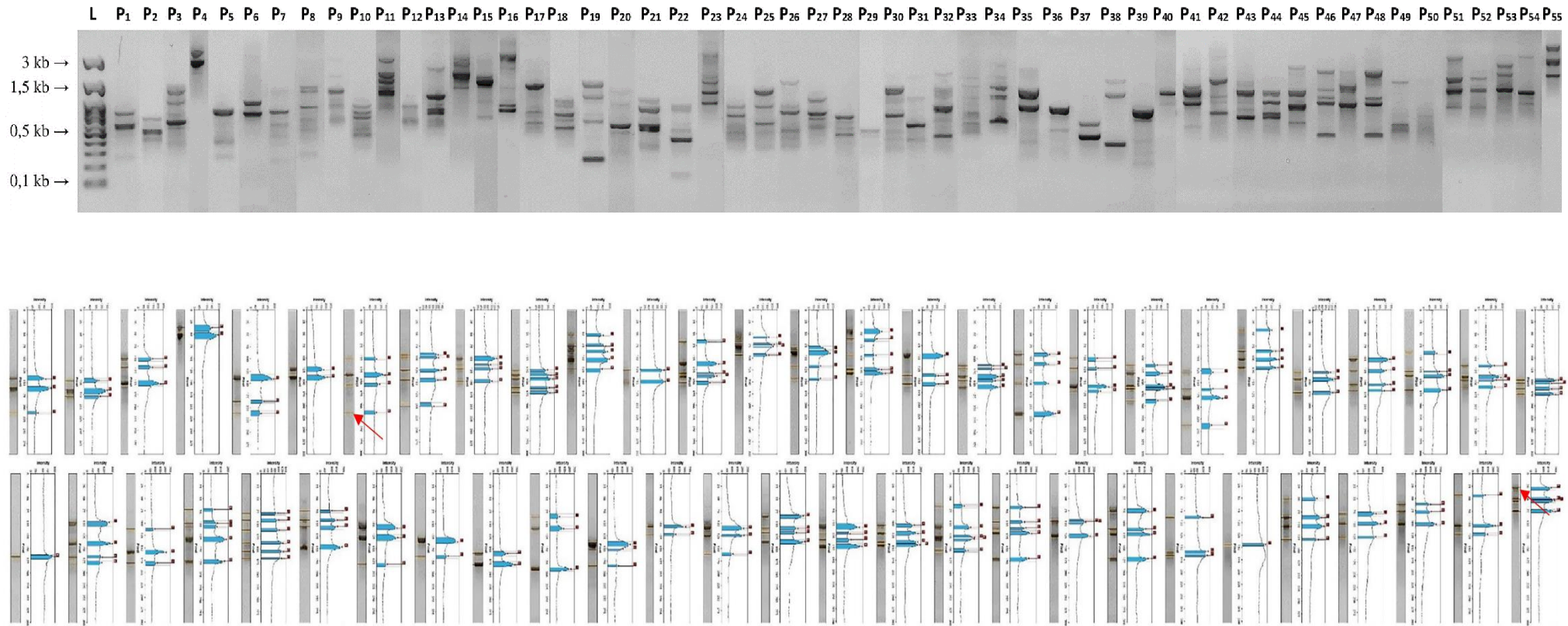
Prilog 4. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni RAPD-PCR metodom sa RAPD 272 prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Crvenom strelicom na slici je obeležena jedinstvena traka, a žuto su označeni jedinstveni profili. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 2.10.1, 2.10.2, 2.11, 2.12.1, 2.13.2, 21.7, 22.1/1, 22.1/2, 22.2, 22.3, 23.2, 24.1, 26.5, 26.9.1, 12.7, 13.2, 13.3, 13.4.2, 14.3.1/1, 12.9.2; **P2:** 2.12.2, 2.13.1, 20.2, 22.5.1, 27.8/1, 27.9, 11.2.2, 16.1.2/1, 27.8/2; **P3:** 6.6.1, 13.4.2/2, 26.9.2, 27.3, 10.8.2, 36.5/1, 36.5/2; 9.4; **P4:** 12.8, 9.2, 29.2, 23.3.2, 6.5, 35.8; **P5:** 12.9.1, 34.2, 35.3, 39.3, 33.2, 33.3, 35.1/2, 35.2, 35.5, 35.6, 35.7; **P6:** 15.4.2, 16.1.1/1, 18.2, 3.2; **P7:** 16.1.2/2, 19.1, 8.2.2; **P8:** 16.4, 17.1; **P9:** 17.2, 2.14; **P10:** 17.4, 18.1, 2.15, 3.1; **P11:** 8.1, 11.3.1, 11.3.2, 11.2.2; **P12:** 19.2, 2.3/2, 2.6, 2.9.1, 2.9.2, 2.7; **P13:** 9.3, 19.4; **P14:** 18.3, 18.4, 20.1, 20.3/1, 20.3/2; **P15:** 21.1/1, 21.1/2, 21.3, 12.2, 12.2/1, 12.2/2, 12.1; **P16:** 21.4, 12.3, 28.3, 29.6, 30.5, 40.1, 50.2/1, 40.5, 40.2, 38.4.1, 38.4.2, 40.6/1, 40.6/2, 50.4; **P17:** 21.5/1, 21.6, 12.4, 12.5; **P18:** 22.5.2, 13.1; **P19:** 20.4/2, 11.4; **P20:** 27.1, 27.5/2, 27.6/2, 27.8/1, 28.3; **P21:** 8.1.1, 6.4, 6.1.2, 1.1, 2.1.2, 2.1.3, 26.4; **P22:** 7.1.1, 7.1.2; **P23:** 6.3, 6.2.3, 6.1; **P24:** 5.4, 5.3; **P25:** 5.1.3, 5.1.2, 5.1.1, 4.1.2, 4.1.1, 3.1.2, 3.1.3; **P26:** 34.5, 36.1, 37.1, 37.1(II), 37.2/2, 15.2, 32.1, 34.7; **P27:** 31.3, 32.4, 32.5, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 34.1, 34.4, 36.6/1, 37.6, 14.4.2/2, 2.3/1, 32.3, 33.4; **P28:** 5.2, 32.6, 2.8; **P29:** 8.2, 8.2.1, 8.3, 8.4, 38.2; **P30:** 10.8.1, 10.5.1, 10.5.2, 10.6; **P31:** 32.8, 31.2, 32.3; **P32:** 30.6.1; **P33:** 37.5, 38.1, 35.4/1, 35.1/1; **P34:** 28.2/1, 28.2/2, 29.3, 29.7, 2.4; **P35:** 28.4, 29.5; **P36:** 30.1, 30.2, 30.7/1, 30.7/2, 36.3, 15.4.1; **P37:** 10.4.1, 10.4.2, 28.6, 29.1, 27.4, 20.4/1, 26.3, 28.5; **P38:** 9.1, 11.2.1, 13.4.2/1, 14.3.1/2, 14.3.2, 14.4.2/1, 14.6, 27.7, 26.10/1, 26.10/2, 40.3, 27.6/2, 26.8, 39.2, 19.3, 22.4, 35.4/2, 34.3, 29.4, 20.4.1; **P39:** 11.1, 23.4, 26.1; **P40:** 2.5.2, 26.4, 10.7, 37.7, 32.7, 50.2/2; **P41:** 16.2; **P42:** 27.5/1, 31.1, 27.2; **P43:** 12.6; **P44:** 30.3



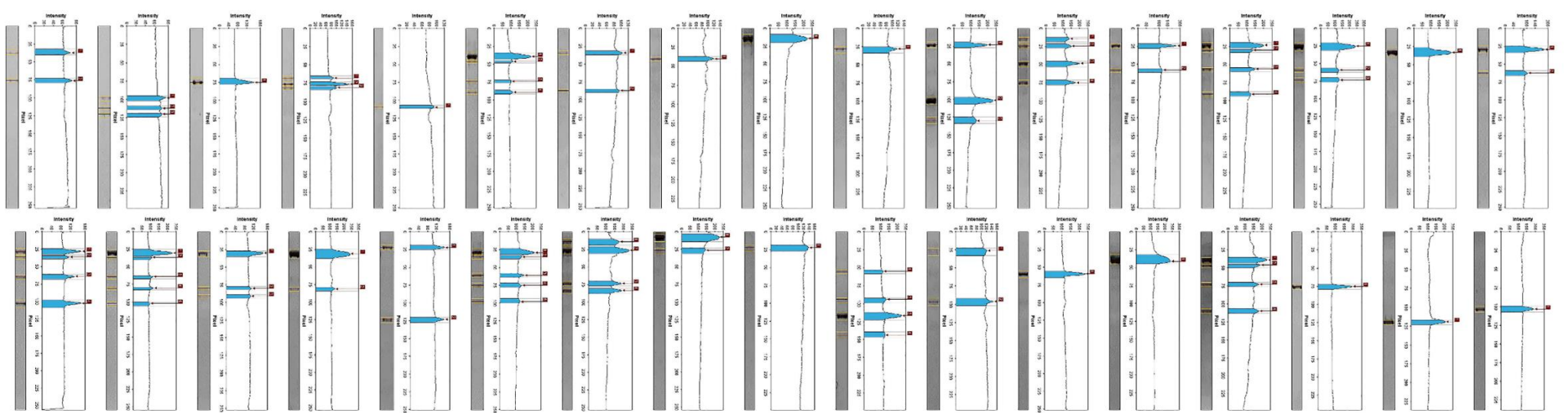
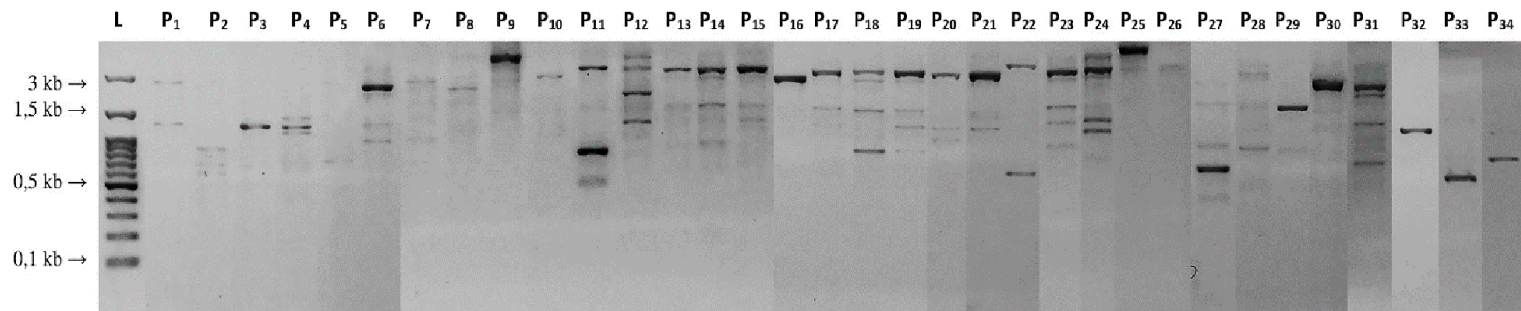
Prilog 5. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni RAPD-PCR metodom sa OPB 07 prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Crvenom strelicom na slici je obeležena jedinstvena traka, a žuto su označeni jedinstveni profili. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 22.5.2, 26.9.2, 27.1, 27.6/2, 37.4, 39.3, 31.2, 31.3, 32.3, 32.4, 32.5, 10.1, 10.2, 22.4, 36.2, 36.4, 30.3, 38.2, 40.6/1; **P2:** 17.3, 20.2, 20.3/2, 20.3/1, 20.4/1, 21.1/1, 22.1/2, 19.4, 18.1, 18.4, 24.1, 29.4/2; **P3:** 21.6, 22.5.1, 27.7, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 34.1, 34.4, 34.5, 34.7, 35.1/1, 35.2, 35.5, 35.7, 35.3; 35.6, 35.8, 36.6/1, 36.6/2, 37.2/1, 37.2/2, 37.3, 37.6, 37.4, 22.3, 23.3.1; **P4:** 26.1, 26.5, 27.6/1, 27.8/1, 21.4, 29.6, 30.1, 30.2, 30.7/1, 30.7/2, 30.5; **P5:** 17.1, 11.1, 35.4/2, 31.1, 26.3, 23.4, 39.1, 39.2; 32.1, 33.1, 21.3, 21.7; **P6:** 22.1/1, 22.1/2, 27.8/2, 10.3, 10.4.1, 10.4.2, 6.5; **P7:** 23.3.2, 26.9.1, 27.4, 2.5.1, 2.5.2; **P8:** 2.3/1; **P9:** 10.7, 2.4, 2.14; **P10:** 1.1, 2.1.2, 2.1.3, 29.2; **P11:** 10.5.1, 10.5.2, 2.12.1, 2.3/2; **P12:** 15.4.1, 16.1.1/1; **P13:** 16.2, 16.4; **P14:** 28.1, 28.2/1, 28.2/2, 29.7, 29.4, 30.6.1, 32.7, 30.4, 36.3; 3.1.3, 5.1.2, 4.1.1, 4.1.2, 5.1.1, 5.1.3, 5.2, 5.3, 5.4, 6.1, 6.1.2, 6.3, 7.1.1, 7.1.2, 8.1.1, 8.1.2, 9.2, 9.4, 12.6.1, 12.6.2; **P15:** 21.5/1, 27.5/2, 29.3, 40.6/2; **P16:** 50.2/1, 50.4, 6.2.3, 18.2; **P17:** 35.1/2, 35.4/1, 36.5/1; 37.7, 38.1; **P18:** 28.4, 29.5, 28.6, 29.1, 20.1, 10.6; **P19:** 18.3, 36.5/2; **P20:** 19.1; **P21:** 22.2; **P22:** 23.2; **P23:** 27.9; **P24:** 38.4; **P25:** 28.5; **P26:** 36.1; **P27:** 26.8, 40.1, 26.7, 50.2/2; **P28:** 8.2.2; **P29:** 10.8.1, 10.8.2; **P30:** 26.4, 40.2, 40.5; **P31:** 32.6, 26.10/1, 26.10/2; **P32:** 27.2; 27.5/1; **P33:** 37.5; **P34:** 50.4.



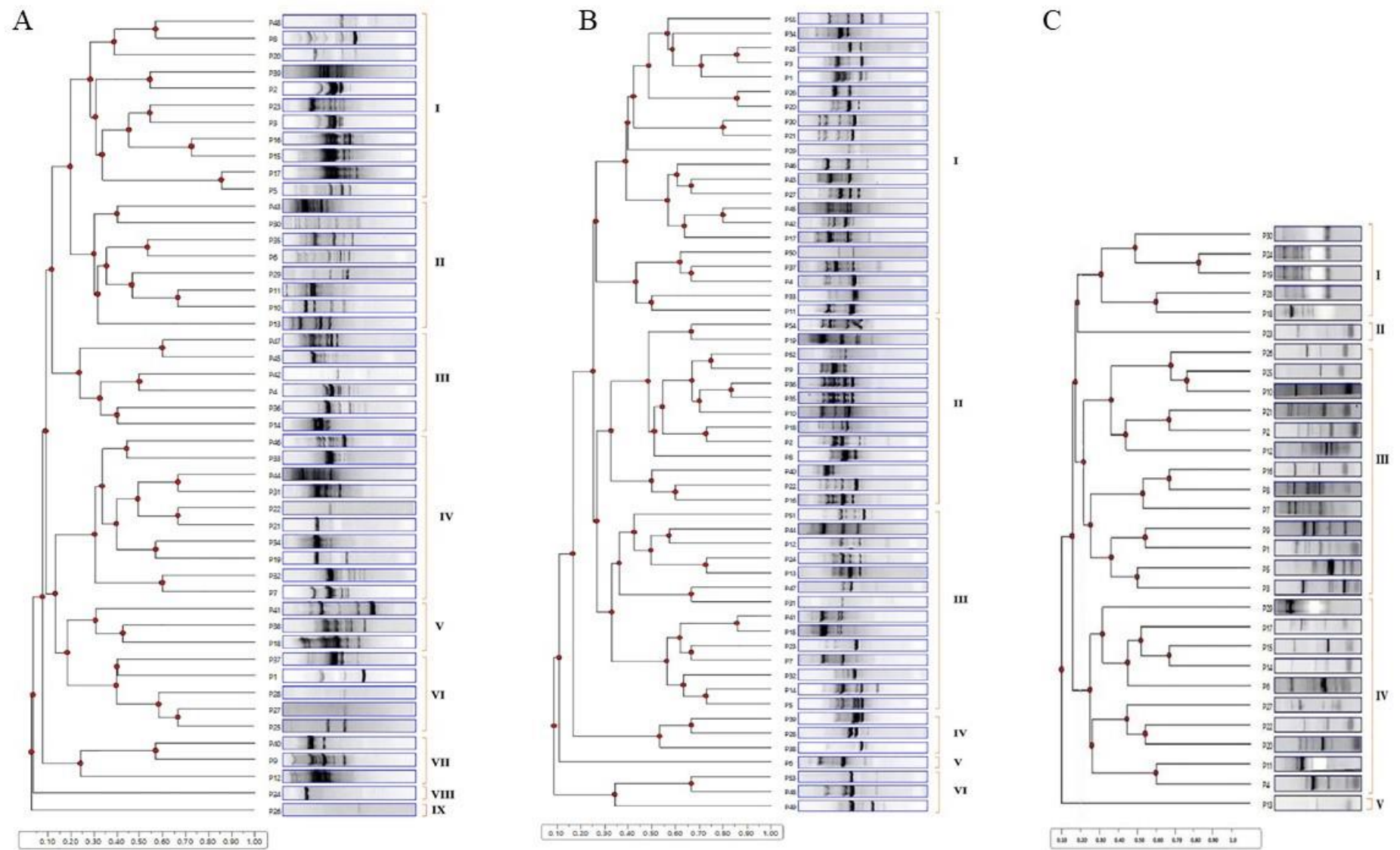
Prilog 6. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni RAPD-PCR metodom sa OPO 02 prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Crvenom strelicom na slici je obeležena jedinstvena traka, a žuto su označeni jedinstveni profili. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 8.1.2; **P2:** 2.3/1, 27.5/1, 27.2, 10.2, 2.8, 37.5; **P3:** 2.11, 2.13.1/2.13.2, 2.15, 12.5, 12.6.1, 12.7, 12.8, 18.1, 16.1.2/1, 16.1.2/2, 27.9, 30.4, 3.1.3, 5.1.2, 4.1.1,4.1.2, 5.1.1,5.1.3, 6.5, 2.7; **P4:** 2.6, 2.9.1, 2.9.2, 2.12.2, 3.1, 2.10/1, 2.10/2; **P5:** 2.10/1, 2.10/2, 3.2, 3.1.2, 15.4.1, 16.1.1/1, 35.1/1, 10.1, 11.1, 2.3/2, 2.5.1, 2.5.2; **P6:** 2.12.1, 8.2.2, 11.2.1, 22.4, 21.6, 24.1, 10.4.1/10.4.2, 26.9.2, 32.1, 37.5; **P7:** 1.1, 2.1.2, 2.1.3, 32.6; **P8:** 6.6.1, 6.4, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 34.2, 34.3, 35.2, 35.5, 35.7, 35.6, 35.8, 6.1, 6.1.2, 6.3, 6.2.3, 5.4, 26.10/1, 26.10/2, 27.6/1, 27.6/2, 31.1, 8.2.1, 10.5.1, 10.5.2; **P9:** 9.1, 9.3, 14.4.1, 38.1; **P10:** 12.3, 26.1, 26.5, 29.6, 30.5, 10.6, 26.7, 26.3, 13.2, 13.3, 13.4.1, 13.4.2/1, 13.4.2/2, 27.6; **P11:** 18.2, 16.2, 16.4, 17.3, 18.2, 28.1, 28.5, 36.1, 36.2, 50.4, 14.6; **P12:** 12.6.1, 12.6.2, 38.4.1, 38.4.2, 26.9.1; **P13:** 23.2, 30.1, 30.2;30.7/1, 30.7/2, 10.8.1, 10.8.2, 26.4, 27.4, 40.3, 10.7, 15.2, 20.1, 21.4, 22.2, 28.6, 29.1, 29.2; **P14:** 5.2, 7.1.1, 7.1.2; **P15:** 36.6/1, 36.6/2, 26.8, 27.2, 27.5/1, 12.4, 23.4; **P16:** 27.8/1; 28.3, 31.2/31.3, 32.3/32.4, 32.5, 35.1/2, 35.3, 50.2/1, 23.3.2, 27.8/2; **P17:** 2.4, 2.14, 35.4/1, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 34.1, 34.4, 10.3; **P18:** 40.6/2; **P19:** 8.1.1, 9.2, 5.3.



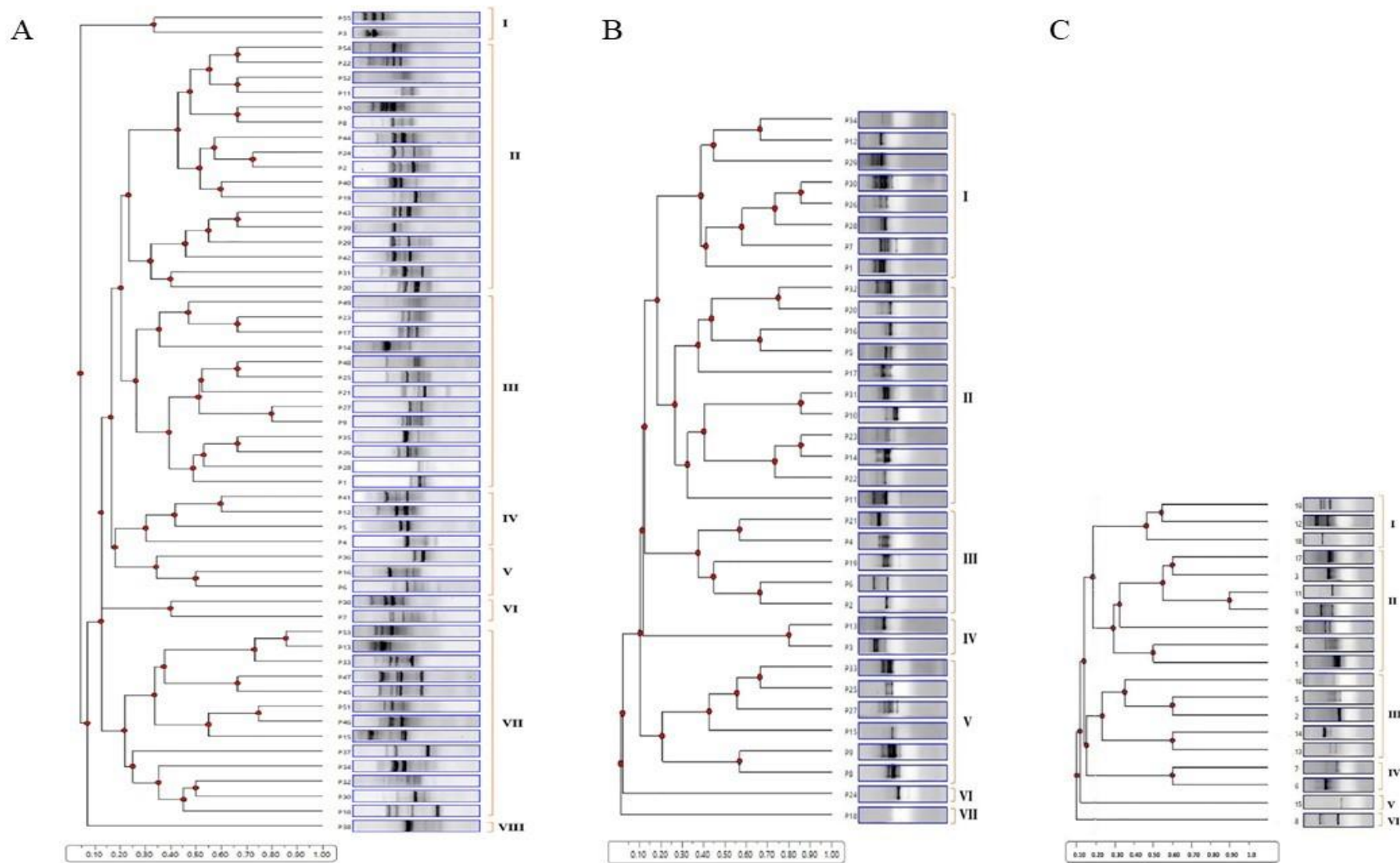
Prilog 7. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni RAPD-PCR metodom sa OPG 5 prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Crvenim strelicama na slici su obeležene jedinstvene trake, a žuto su označeni jedinstveni profili. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.11, 12.9.2, 13.1, 15.4.2, 14.3.2, 2.12.1, 8.2.2; **P2:** 15.2, 16.2, 16.4, 11.2.2, 17.1, 13.2, 13.3, 13.4.1, 14.4.1, 22.5.1, 39.3; **P3:** 19.2, 19.3, 18.3, 17.4, 20.3/1, 20.3/2, 20.4/1, 20.4/2, 21.1/1; **P4:** 40.6/1, 38.2, 35.4/1, 35.1.1/1, 35.4/2; **P5:** 2.3/1, 2.8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 12.4, 12.5; **P6:** 10.8.1, 10.8.2, 6.5, 10.3, 2.5.1, 2.5.2, 27.8/1, 28.3, 23.2, 22.1/1, 22.1/2, 21.1/2, 18.4, 18.1, 17.3; **P7: 6.6.1**; **P8:** 12.6.3, 12.7, 12.8, 12.6.1, 12.6.2, 12.9.1, 14.3.1/1, 14.3.1/2, 14.4.2/1, 14.4.2/2, 15.4.1, 16.1.1/1, 16.1.2/1, 16.1.2/2; **P9:** 34.5, 34.7, 35.3, 37.1, 37.1(II), 50.21, 50/2, 40.6/2; **P10:** 2.15, 12.1, 12.2/1, 12.2/2, 3.1; **P11:** 30.5, 30.4, 40.1; **P12:** 35.2, 35.5, 35.7, 35.1/2, 34.2, 34.3, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 34.1, 34.4, 32.5, 32.3, 32.4, 31.2, 31.3, 35.6, 35.8, 36.6/1; **P13:** 21.4, 26.1, 26.5; **P14:** 38.1, 37.5, 26.7, 26.4; **P15:** 40.1, 11.1, 26.9.1, 27.3, 27.4, 10.1; **P16:** 3.1.3, 5.1.2, 4.1.1, 4.1.2, 5.1.1, 5.1.3, 8.1.2, 36.4; **P17:** 21.5/1, 21.6, 22.3, 23.3.1, 24.1, 18.2, 37.7, 37.4, 37.2/1, 36.6/2, 36.5/1, 36.3, 36.2, 36.1, 32.8; **P18:** 2.7, 11.2.1; **P19:** 27.5/1, 27.8/2, 28.6, 29.1, 40.2, 50.4; **P20:** 29.4, 30.6.1, 32.7, 29.2, 2.3/2; **P21:** 27.6/1, 29.6, 30.1, 30.2, 30.7/1, 30.7/2, 6.1, 6.1.2, 6.3, 6.2.3, 8.1.1, 8.2.1, 9.2, 9.4; **P22:** 27.6/2, 28.1; **P23:** 2.6, 9.1, 9.3; **P24:** 2.9.1, 2.9.2; **P25:** 2.4, 2.14, 2.10/1, 2.10/2, 2.12.2; **P26:** 2.13.1, 2.13.2, 11.4, 12.3; **P27:** 3.2, 3.1.2; **P28:** 14.6; **P29:** 19.1, 5.3; **P30:** 19.4; **P31:** 20.1; **P32:** 22.2, 5.2, 7.1.1, 7.1.2; **P33:** 22.4, 22.5.2, 27.1, 10.2, 10.7; **P34:** 40.3, 39.1, 39.2, 10.6, 27.9; **P35:** 26.9.2, 21.3, 21.7, 28.2/1, 28.2/2, 29.7, 38.4.2; **P36:** 28.4, 29.5; **P37:** 28.5; **P38:** 5.4; **P39:** 29.3; **P40:** 10.4.1, 10.4.2; **P41:** 10.5.1, 10.5.2; **P42:** 23.3/2; **P43:** 23.4; **P44:** 26.3; **P45:** 26.8; **P46:** 26.10/1, 26.10/2; **P47:** 27.2; **P48:** 27.6; **P49:** 31.1; **P50:** 32.6; **P51:** 35.4/1, 40.5; **P52:** 39.1, 39.2, 30.5; **P53:** 30.3; **P54:** 33.1; **P55: 38.4**.



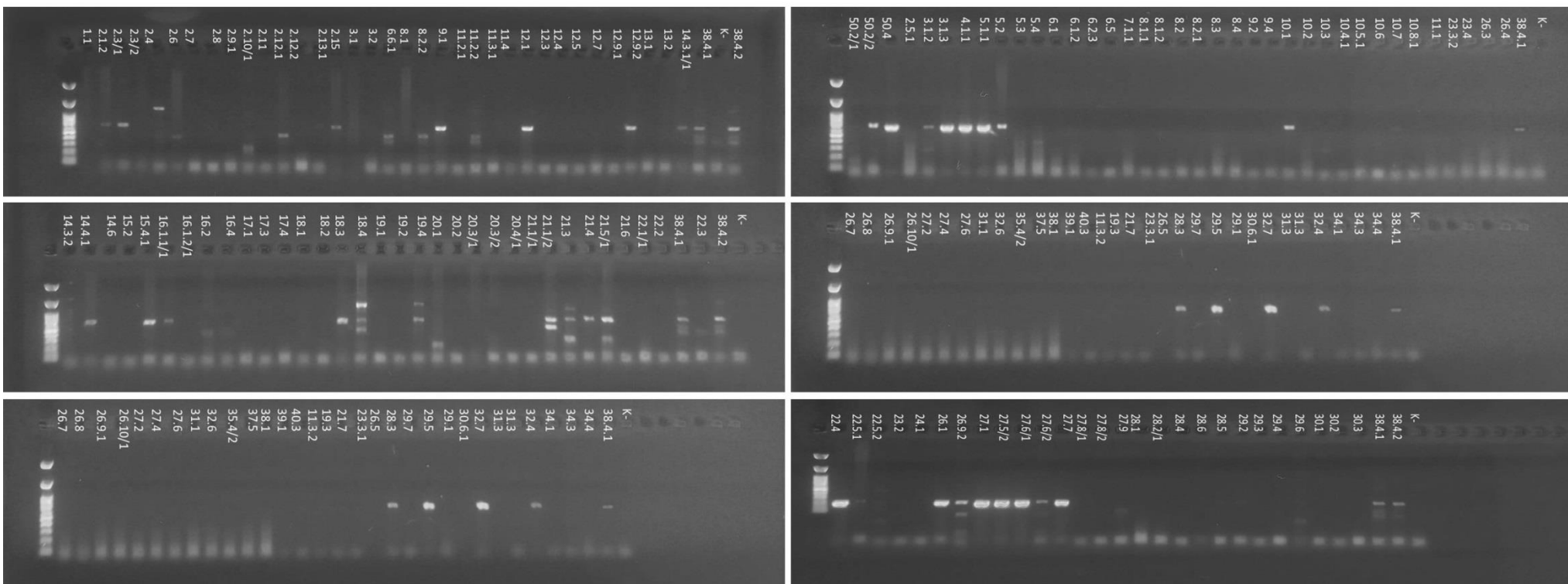
Prilog 8. Genetički profili *Bacillus* spp. izolata dobijeni RAPD-PCR metodom sa RAPD 1247 prajmerima, prikazani na agaroznom gelu i prevedeni u digitalni format. Profili su sadržali sledeće *Bacillus* spp. SS izolate: **P1:** 2.3/1, 36.5/2; **P2:** 2.4, 2.14; **P3:** 2.7, 2.12.1, 2.13.1, 2.13.2, 3.1, 19.2, 19.3; **P4:** 2.9.1, 2.9.2; **P5:** 3.2, 3.1.2, 40.2, 50.4; **P6:** 6.6.1, 6.4, 8.1, 8.2.8.3, 8.4; **P7:** 8.2.2; **P8:** 9.1, 9.3, 28.2/1, 28.2/2, 29.7, 29.4, 30.6.1, 32.7, 27.9, 8.1.1, 26.8, 20.2, 5.3, 6.1, 10.7, 32.6; **P9:** 11.2.1; **P10:** 11.4; **P11:** 12.1, 12.2/1, 12.2/2, 21.4, 40.5; **P12:** 12.4; **P13:** 2.6.3, 12.7, 12.8, 12.6.1, 12.6.2, 14.3.2, 20.4/1, 20.4/2, 22.1/1, 22.1/2; **P14:** 12.9.1, 14.4.1, 38.4, 38.4.2; **P15:** 15.2, 16.2, 16.4, 17.3, 18.2, 22.3, 23.3.1, 22.5.1, 31.2, 31.3, 37.1, 37.1 (II); **P16:** 13.1, 15.4.2, 14.3/1, 14.3/2, 14.4.2/1, 14.4.2/2, 20.3/2; **P17:** 15.4.1, 21.5/1, 21.6, 27.6/2; **P18:** 16.1.1/1; **P19:** 16.1.2/1, 16.1.2/2, 18.1, 29.6, 30.5, 27.6/1; **P20:** 18.3; **P21:** 19.4, 36.5/1; **P22:** 32.1, 20.1, 33.1; **P23:** 20.3/1, 21.1/2, 21.1/1; **P24:** 21.3, 21.7, 22.4, 26.9.2; **P25:** 22.5.2, 30.2, 30.7/1, 30.7/2; **P26:** 23.2, 26.1, 26.5, 27.1, 40.6/1; **P27:** 28.6, 29.1, 29.3, 27.8/2; **P28:** 28.5; **P29:** 30.1, 34.5, 34.7; **P30:** 27.5/2; **P31:** 30.3; **P32:** 30.4; **P33:** 32.5, 32.8, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 34.1, 34.4, 34.2, 34.3, 35.1/2, 35.2, 35.5, 35.7, 35.6, 35.8, 36.1, 36.6/2, 37.2/1, 37.7/2, 37.3, 37.6, 37.4, 37.7; **P34:** 40.1, 50.2/2.



Prilog 9. Srodnost *Bacillus* spp. izolata prikazana kroz klustere dendrograma dobijenih rep-PCR metodom sa sledećim prajmerima: BOX-A1R (A); (GTG)5 (B) i ERIC-1R i ERIC-2 (C).



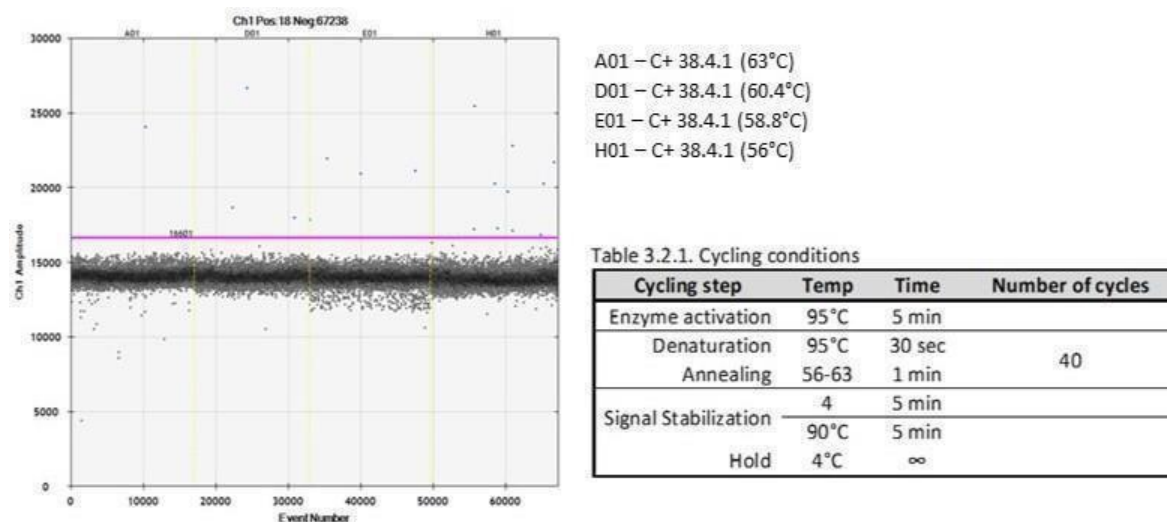
Prilog 10. Srodnost *Bacillus* spp. izolata prikazana kroz klustere dendrograma dobijenih RAPD-PCR metodom sa sledećim prajmerima: OPG 5 (A); OPB 07 (B) i OPO 02 (C).



Prilog 11. Rezultati SCAR_{38.4}-PCR na celokpunoj *Bacillus* spp. kolekciji.

Optimizacija SCAR38.4-ddPCR programa

Prilog 13. Prvi korak optimizacije SCAR_{38.4}-ddPCR programa u kome su testirane četiri temperature hibridizacije (63, 60,4; 58,8 i 56 °C) na pozitivnoj kontroli (genomska DNK SS-38.4). Rezultati nisu bili zadovoljavajući.

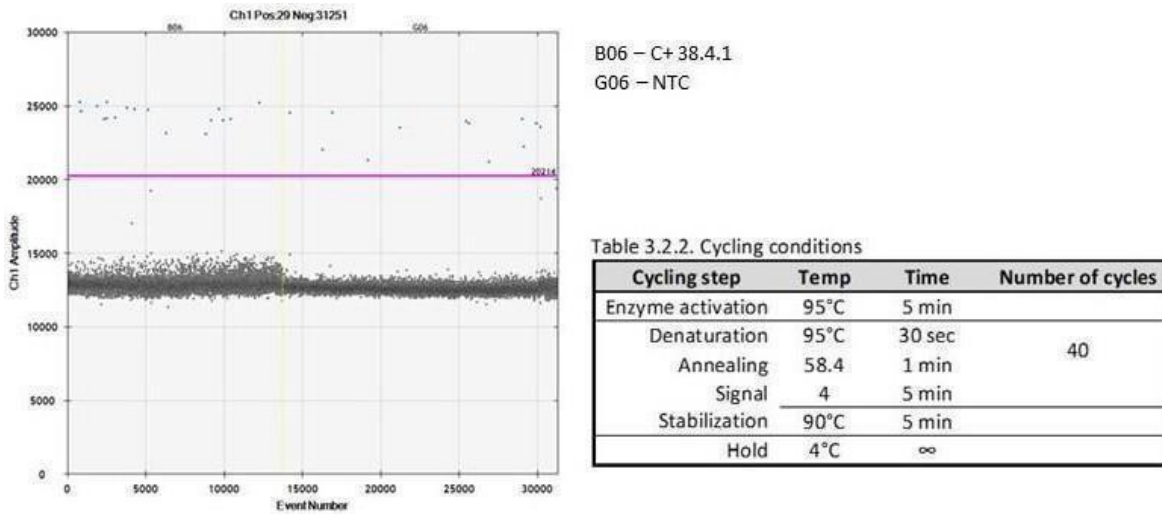


Slika 13.1. 1-D grafik amplitude gradijent ddPCR reakcije. Sa temperatura od 58,8 °C postignuto je najbolje razdvajanje pozitivnih i negativnih kapljica. Međutim, koncentracija umnoženog specifičnog fragmenta je bila niska.

Tabela 13.2. Rezultati prvog gradijent ddPCR-a.

| Uzorak | Temperatura [°C] | Broj kapljica | pozitivne | Kopije/ μ l reakcije | Koncentracija uzorka [kopije/ μ l] |
|----------|------------------|---------------|-----------|--------------------------|--|
| C+38.4.1 | 63 | 17115 | 1 | 0.069 | 0.687 |
| C+38.4.1 | 60.4 | 15895 | 3 | 0.222 | 2.221 |
| C+38.4.1 | 58.8 | 16641 | 4 | 0.283 | 2.828 |
| C+38.4.1 | 56 | 17605 | 10 | 0.668 | 6.684 |

Prilog 14. Ponovljeni uslovi odvijanja ddPCR reakcije na pozitivnoj kontroli, ali sa jednom odabranom temperaturom hibridizacije od 58,4 °C. Koncentracija umnoženog fragmenta je i dalje niska, a javlja se i problem detekcije kapljica u NTC.

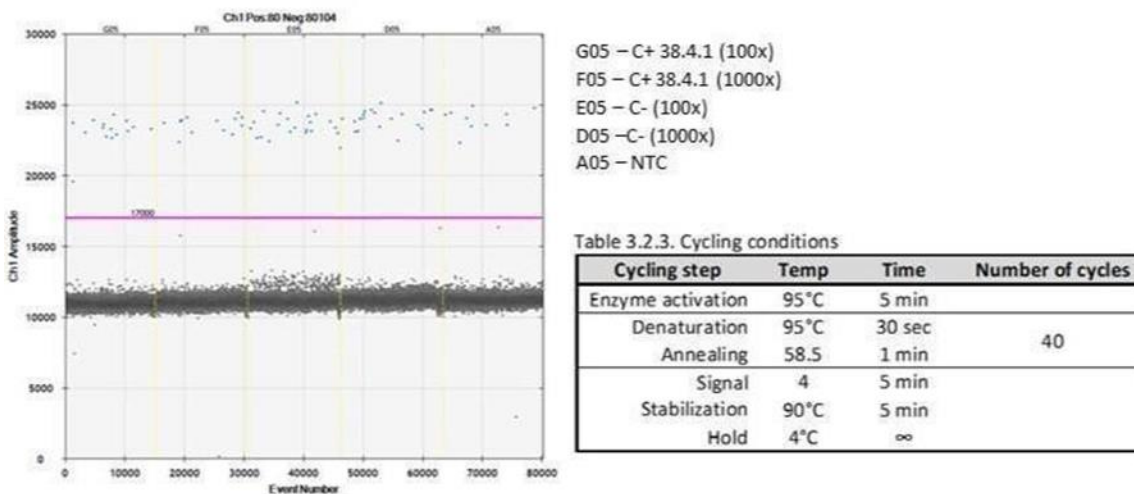


Slika 14.1. 1-D grafik amplitude nakon amplifikacije pozitivne kontrole i NTC. Broj pozitivnih kapljica u NTC je veći nego u pozitivnoj kontroli.

Tabela 14.2 Rezultati ddPCR-a za pozitivnu kontrolu i NTC.

| Uzorak | Broj kapljica | Pozitivne | Kopije/μl reakcije | Koncentracija uzorka [kopije/μl] |
|-----------|---------------|-----------|--------------------|----------------------------------|
| PK (bac) | 13752 | 17 | 1.455 | 14.552 |
| NTC (bac) | 17528 | 12 | 0.806 | 8.057 |

Prilog 15. Testiranje senzitivnosti ddPCR kroz serijska razblaženja pozitivne kontrole. U test je pored NTC uključena i negativna kontrola (biljna DNK). Očekivani rezultati dobijeni su samo za negativnu kontrolu. U NTC su ponovo uočene pozitivne kapljice, dok je koncentracija pozitivne kontrole i dalje bila niska.

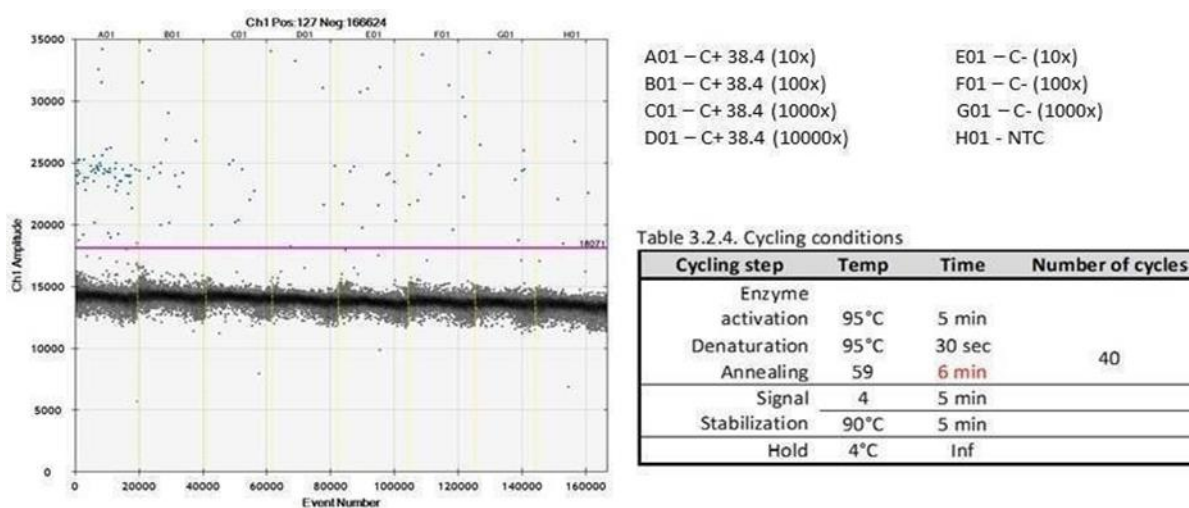


Slika 15.1. 1-D grafik amplitude ddPCR nakon amplifikacije DNK pozitivne i negativne kontrole i NTC.

Tabela 15.2. Rezultati ddPCR za seriju razblaženja pozitivne kontrole, negativnu kontrolu i NTC.

| Uzorak | Broj kapljica | Pozitivne | Kopije/ μ l reakcije | Koncentracija uzorka [kopije/ μ l] |
|----------|---------------|-----------|--------------------------|--|
| C+ 100x | 15264 | 15 | 1.157 | 1156.691 |
| C+ 1000x | 15448 | 13 | 0.990 | 9904.555 |
| C- 100x | 15557 | 22 | 1.665 | 1664.889 |
| C- 1000x | 17306 | 20 | 1.360 | 13603.963 |
| NTC | 16609 | 10 | 0.709 | 7.085 |

Prilog 16. ddPCR sa produženim vremenom hibridizacije i različitim koncentracijama pozitivne kontrole.

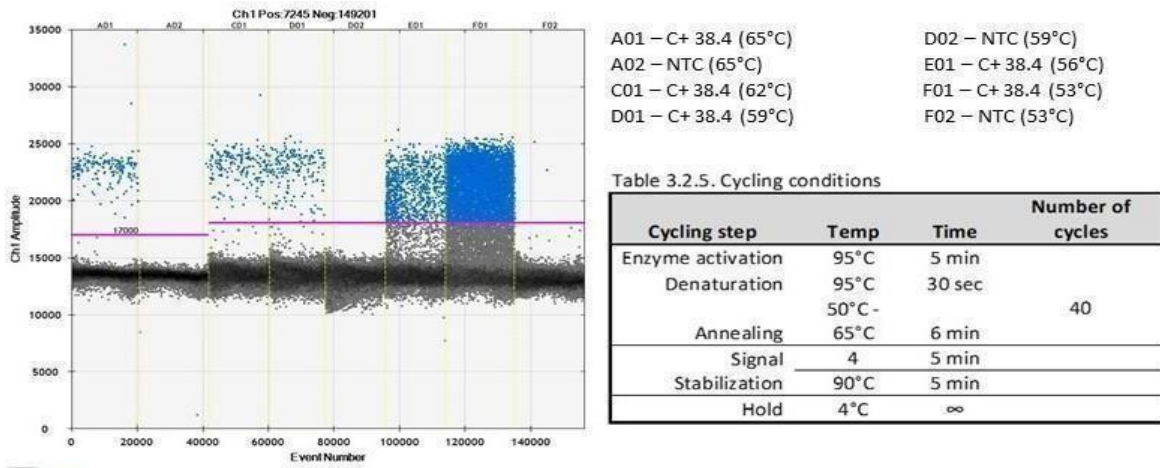


Slika 16.1. 1-D grafik amplitude ddPCR nakon amplifikacije različitih razblaženja pozitivne kontrole i NTC.

Tabela 16.2. Rezultati ddPCR za seriju razblaženja pozitivne kontrole i NTC, sa produženom hibridizacijom.

| Uzorak | Broj kapljica | Pozitivne | Kopije/ μ l reakcije | Koncentracija uzorka [kopije/ μ l] |
|----------------|---------------|-----------|--------------------------|--|
| C+ 38.4 10x | 19829 | 63 | 3.744 | 374.379 |
| C+ 38.4 100x | 21262 | 15 | 0.830 | 830.274 |
| C+ 38.4 1000x | 20729 | 9 | 0.511 | 5109.043 |
| C+ 38.4 10000x | 20733 | 5 | 0.284 | 28375.355 |
| C- 10x | 22117 | 13 | 0.692 | 69.171 |
| C- 100x | 20896 | 11 | 0.619 | 619.477 |
| C- 1000x | 18925 | 7 | 0.435 | 4352.347 |
| NTC | 22260 | 4 | 0.211 | 2.114 |

Prilog 17. Gradijent ddPCR sa produženim vremenom hibridizacije.

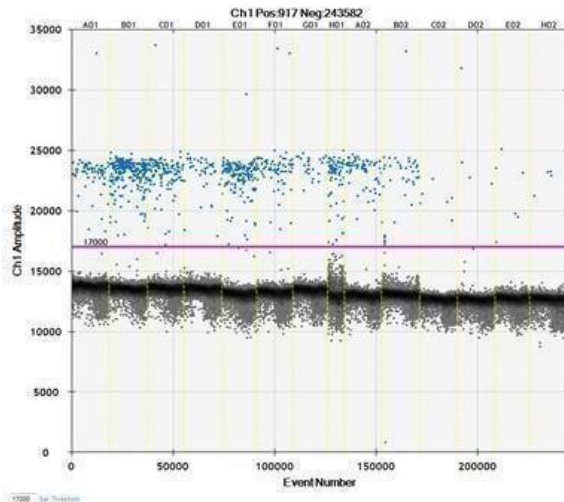


Slika 17.1. 1-D grafik amplitude gradijent ddPCR nakon amplifikacije pozitivne kontrole i NTC. Najbolje razdvajanje pozitivnih i negativnih kapljica se uočava na temperaturi od 65 °C.

Tabela 17.2. Rezultati drugog gradijent ddPCR-a, sa produženom hibridizacijom.

| Uzorak | Temperatura [°C] | Broj kapljica | Pozitivne | Kopije/μl reakcije | Koncentracija uzorka [kopije/μl] |
|---------|------------------|---------------|-----------|--------------------|----------------------------------|
| C+ 38.4 | 65 | 20942 | 189 | 10.666 | 213.315 |
| NTC | 65 | 20970 | 1 | 0.056 | 0.561 |
| C+ 38.4 | 62 | 18617 | 185 | 11.749 | 234.985 |
| C+ 38.4 | 59 | 17055 | 178 | 12.343 | 246.863 |
| NTC | 59 | 18387 | 1 | 0.064 | 0.640 |
| C+ 38.4 | 56 | 18196 | 819 | 54.182 | 1083.631 |
| C+ 38.4 | 53 | 21124 | 5870 | 383.021 | 7660.425 |
| NTC | 53 | 21155 | 2 | 0.111 | 1.112 |

Prilog 18. Poređenje ddPCR sa standardnim i produženim vremenom hibridizacije na pozitivnoj kontroli i odabranim uzorcima DNK SS-38.4 izolovanog iz filiosfere.



A01 – C+ 38.4 (5x) F01 – 3 C02 – 4 (5x)
 B01 – C+ 38.4 (5x) G01 – 3 (2x) D02 – C-
 C01 – 2 H01 – 3 (5x) E02 – C- (2x)
 D01 – 2 (2x) A02 – 4 F02 – C- (5x)
 E01 – 2 (5x) B02 – 4 (2x) H02 – NTC

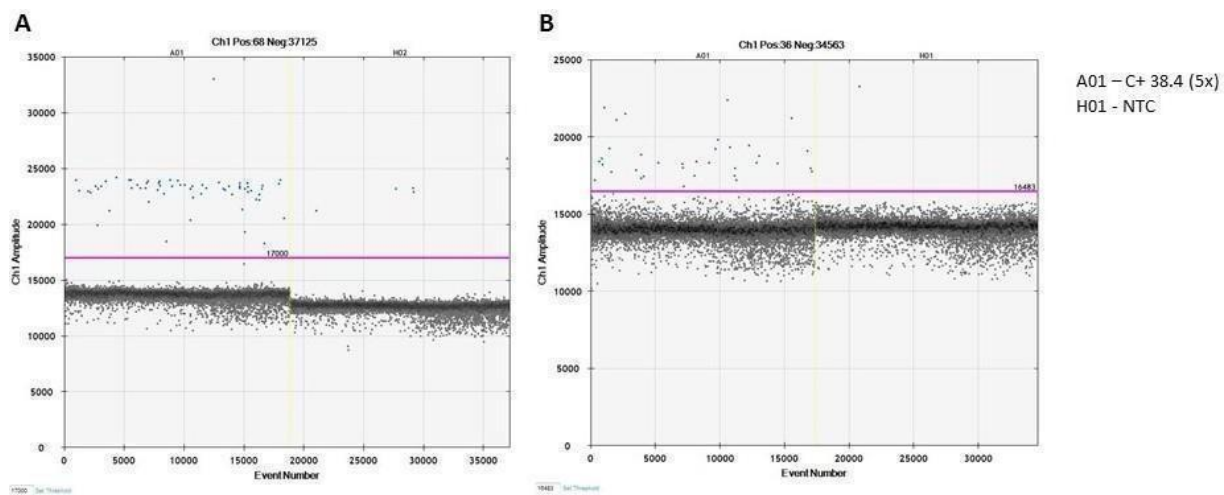
Table 3.2.6. Cycling conditions – optimal protocol

| Cycling step | Temp | Time | Number of cycles |
|-------------------|-------------|--------|------------------|
| Enzyme activation | 95°C | 5 min | 40 |
| Denaturation | 95°C | 30 sec | |
| Annealing | 50°C - 65°C | 6 min | |
| Signal | 4 | 5 min | |
| Stabilization | 90°C | 5 min | |
| Hold | 4°C | ∞ | |

Slika 18.1. 1-D grafik amplitude amplifikacije pozitivne kontrole razblažene 5× i uzoraka razblaženih 2×.

Tabela 18.1. Rezultati ddPCR pozitivne kontrole i uzoraka različitih koncentracija, sa produženom hibridizacije.

| Uzorci | Broj kapljica | Pozitivne | kopije/μl reakcije | Koncentracija uzorka [kopije/μl] |
|--------------|---------------|-----------|--------------------|----------------------------------|
| C+ 38.4 (5x) | 18879 | 63 | 3.932 | 196.625 |
| 2 | 18867 | 248 | 15.567 | 155.668 |
| 2(2x) | 17714 | 122 | 8.131 | 162.613 |
| 2(5x) | 19032 | 40 | 2.475 | 123.761 |
| 3 | 17072 | 149 | 10.313 | 103.130 |
| 3(2x) | 17694 | 71 | 4.730 | 94.605 |
| 3(5x) | 17347 | 26 | 1.765 | 88.232 |
| 4 | 8118 | 68 | 9.896 | 98.961 |
| 4(2x) | 18416 | 66 | 4.224 | 84.477 |
| 4(5x) | 18848 | 44 | 2.750 | 137.482 |
| C- | 18264 | 5 | 0.322 | 3.221 |
| C- (2x) | 18582 | 4 | 0.253 | 5.066 |
| C- (5x) | 17352 | 6 | 0.407 | 20.344 |
| NTC | 18314 | 5 | 0.321 | 3.212 |

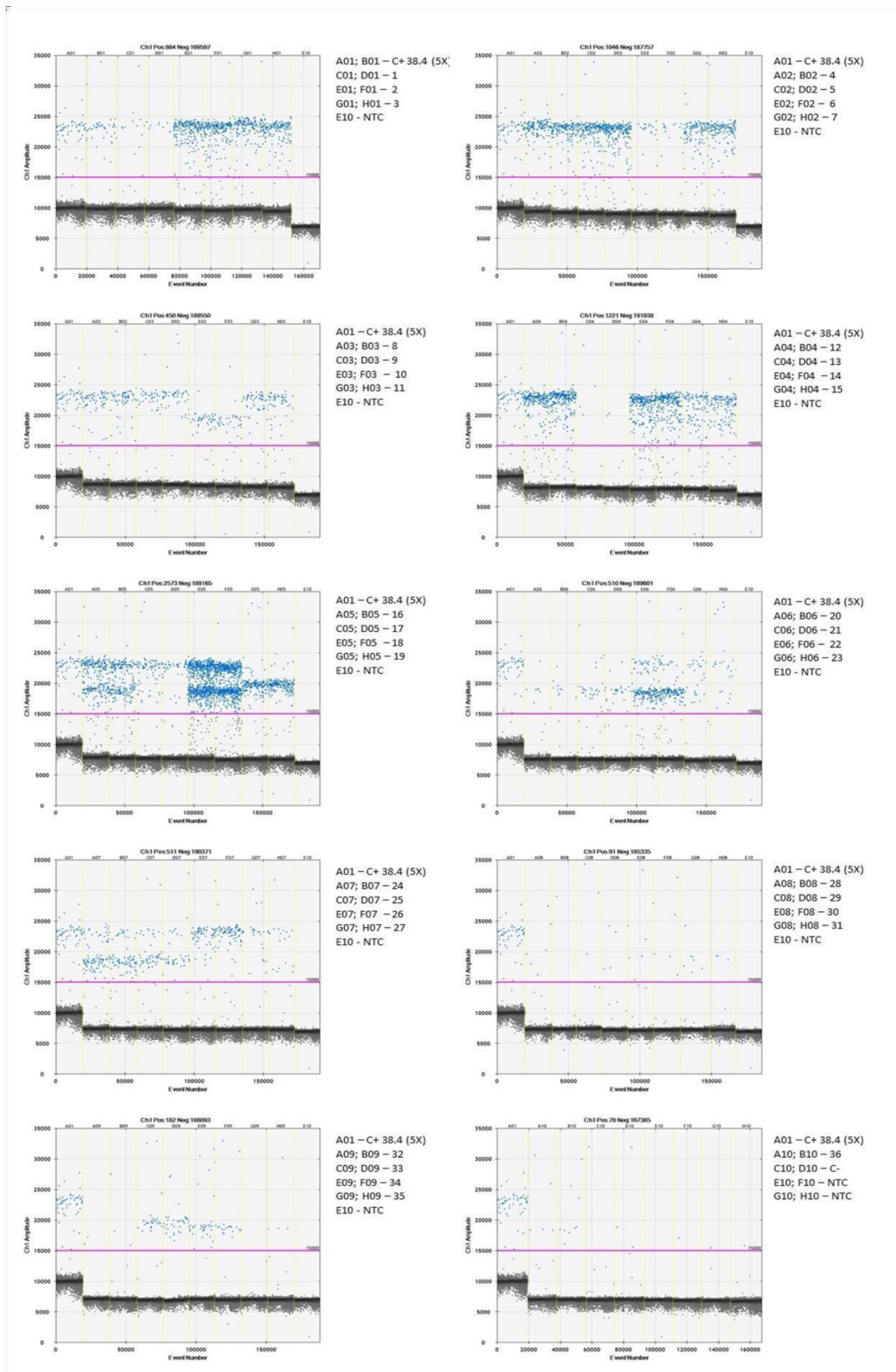


Slika 18.2. 1-D grafici amplitude amplifikacije pozitivne kontrole i NTC, pri standardnom i produženom trajanju hibridizacije.

Tabela 18.2. Rezultati ddPCR za pozitivnu kontrolu pri standardnom vremenu hibridizacije.

| Uzorci | Broj kapljica | pozitivne | kopije/ μ l reakcije | Koncentracija uzorka [kopije/ μ l] |
|--------------|---------------|-----------|--------------------------|--|
| C+ 38.4 (5x) | 17417 | 35 | 2.367 | 118.327 |
| NTC | 17182 | 1 | 0.068 | 0.685 |

Prilog 19. Rezultati optimizovano SCAR38.4-ddPCR za sve uzorke.

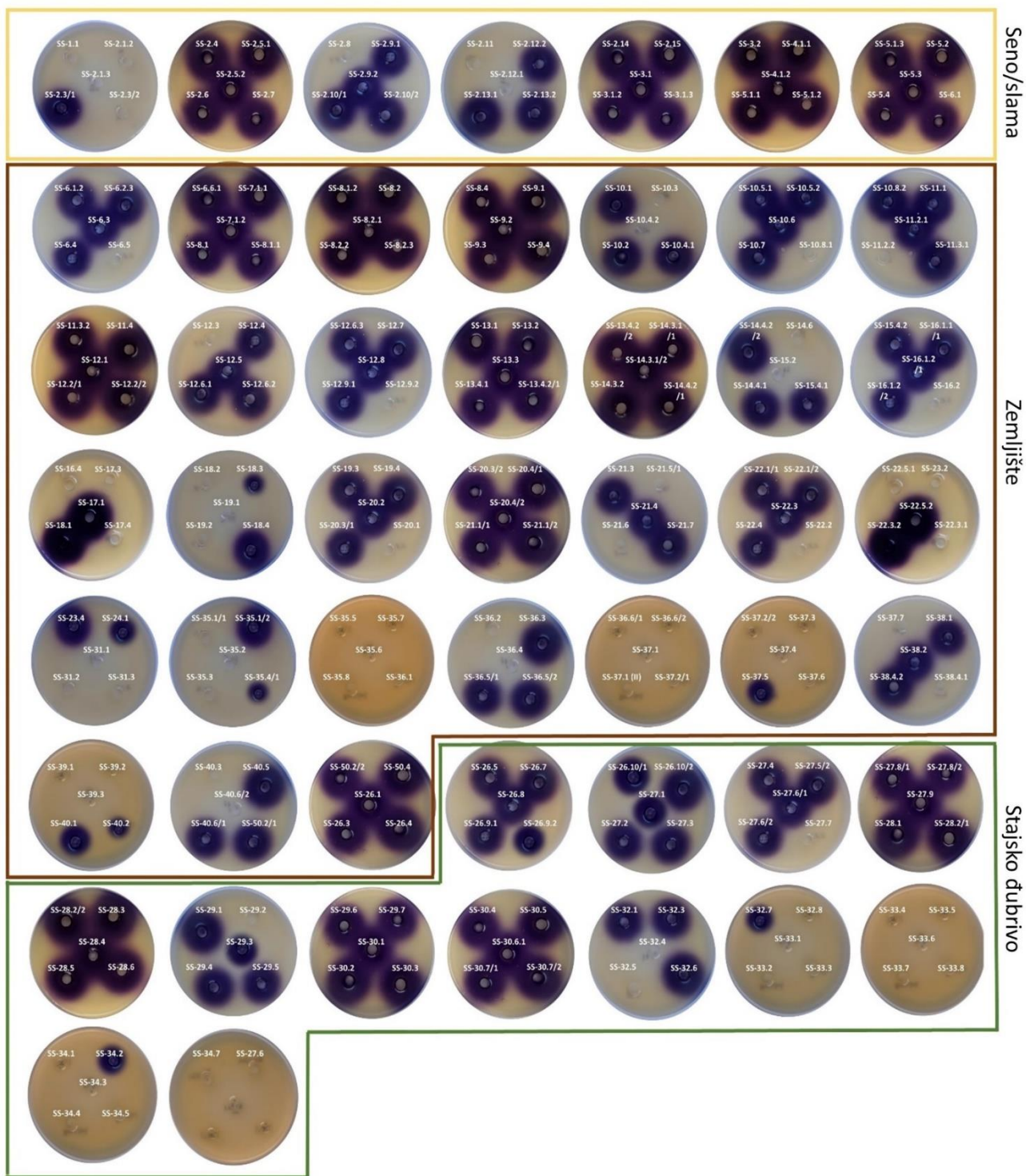


Slika 19.1 1-D grafici amplitude amplifikacije uzoraka DNK SS-38.4 izolovane iz filozofere četiri grupe biljaka pod različitim tretmanima (Kontrolna prskana samo SS-38.4 sojem, T1, T2 i Kontrolna-prskana sterilnom destilovanom vodom-negativna kontrola), nakon 24 sata, 5, 7 i 14 dana od tretmana. ddPCR za sve uzorke je rađen u duplikatu.

Tabela 19.2 Izračunate koncentracije DNK SS-38.4 iz uzoraka.

| Uzorak | Kopija/ μ l reakcije | Koncentracije uzorka [kopije/ μ l] |
|--------------|--------------------------|--|
| C+ 38.4 (5x) | 3.33 | 166.26 |
| | 2.57 | 128.58 |
| 1 | 0.88 | 8.78 |
| | 0.57 | 5.66 |
| 2 | 13.44 | 134.36 |
| | 13.37 | 133.66 |
| 3 | 9.89 | 98.88 |
| | 9.60 | 95.96 |
| 4 | 8.85 | 88.48 |
| | 9.59 | 95.88 |
| 5 | 11.42 | 114.20 |
| | 13.42 | 134.21 |
| 6 | 1.25 | 12.54 |
| | 1.02 | 10.22 |
| 7 | 7.76 | 77.65 |
| | 8.41 | 84.09 |
| 8 | 3.62 | 36.18 |
| | 3.83 | 38.31 |
| 9 | 2.49 | 24.92 |
| | 2.76 | 27.63 |
| 10 | 2.72 | 27.18 |
| | 2.30 | 23.03 |
| 11 | 3.58 | 35.79 |
| | 3.13 | 31.26 |
| 12 | 12.71 | 127.10 |
| | 15.55 | 155.51 |
| 13 | 0.24 | 2.42 |
| | 0.12 | 1.21 |
| 14 | 14.68 | 146.76 |
| | 14.38 | 143.80 |
| 15 | 6.10 | 60.97 |
| | 7.31 | 73.13 |
| 16 | 16.0 | 160.02 |
| | 13.64 | 136.41 |
| 17 | 4.62 | 46.17 |
| | 3.06 | 30.65 |
| 18 | 50.38 | 503.83 |
| | 45.19 | 451.86 |
| 19 | 10.91 | 109.13 |
| | 11.46 | 114.58 |

| Uzorak | Kopija/ μ l reakcije | Koncentracije uzorka [kopije/ μ l] |
|--------|--------------------------|--|
| 20 | 0.49 | 4.88 |
| | 0.68 | 6.75 |
| 21 | 1.65 | 16.52 |
| | 1.69 | 16.91 |
| 22 | 10.91 | 109.13 |
| | 9.65 | 96.52 |
| 23 | 1.82 | 18.23 |
| | 1.51 | 15.13 |
| 24 | 5.66 | 56.61 |
| | 4.65 | 46.47 |
| 25 | 3.39 | 33.92 |
| | 2.39 | 23.88 |
| 26 | 4.12 | 41.19 |
| | 4.88 | 48.80 |
| 27 | 1.63 | 16.26 |
| | 1.15 | 11.45 |
| 28 | 0.36 | 3.65 |
| | 0.07 | 0.69 |
| 29 | 0.20 | 2.03 |
| | 0.26 | 2.55 |
| 30 | 0.45 | 4.51 |
| | 0.31 | 3.15 |
| 31 | 0.40 | 4.01 |
| | 0.20 | 1.97 |
| 32 | 0.12 | 1.22 |
| | 0.18 | 1.82 |
| 33 | 1.75 | 17.50 |
| | 2.23 | 22.29 |
| 34 | 2.20 | 21.97 |
| | 1.34 | 13.40 |
| 35 | 0.00 | 0.00 |
| | 0.25 | 2.50 |
| 36 | 0.39 | 3.86 |
| | 0.56 | 5.61 |
| C- | 0.07 | 0.67 |
| | 0.19 | 1.86 |
| | 0.00 | 0.00 |
| NTC | 0.07 | 0.65 |
| | 0.13 | 1.28 |
| | 0.06 | 0.60 |



Prilog 22. Test inhibicije sinteze violaceina na celokupnoj *Bacillus* spp. kolekciji. Pozitivan rezultat predstavlja izostanak ljubičastog prstena oko bunarića.

Prilog 23. Vrednosti apsorbance violaceina sa 20%, 10% i 5% *Bacillus* spp. ekstrakta.

| Strain | A 585 nm (20%) | A 585 nm (10%) | A 585 nm (5%) |
|--------|-------------------|-------------------|------------------|
| 1.1 | 0,298 | 0,312 | 0,364 |
| 2.1.2 | 0,212 | 0,356 | 0,374 |
| 2.1.3 | 0,109 | 0,225 | 0,357 |
| 2.3/1 | 0,203 | 0,315 | 0,364 |
| 2.8 | 0,309 | 0,345 | 0,371 |
| 2.11 | 0,105 | 0,245 | 0,331 |
| 2.12.1 | 0,219 | 0,335 | 0,348 |
| 6.5 | 0,118 | 0,214 | 0,352 |
| 10.3 | 0,269 | 0,345 | 0,343 |
| 10.4.2 | 0,209 | 0,335 | 0,353 |
| 10.8.1 | 0,272 | 0,356 | 0,394 |
| 11.2.2 | 0,264 | 0,332 | 0,359 |
| 12.3 | 0,290 | 0,355 | 0,385 |
| 12.9.2 | 0,260 | 0,312 | 0,356 |
| 14.6 | 0,252 | 0,356 | 0,396 |
| 15.2 | 0,219 | 0,345 | 0,393 |
| 16.2 | 0,271 | 0,355 | 0,365 |
| 16.4 | 0,283 | 0,351 | 0,395 |
| 17.3 | 0,213 | 0,335 | 0,366 |
| 17.4 | 0,106 | 0,254 | 0,391 |
| 18.2 | 0,282 | 0,316 | 0,368 |
| 19.1 | 0,220 | 0,333 | 0,343 |
| 19.2 | 0,246 | 0,348 | 0,375 |
| 20.1 | 0,207 | 0,325 | 0,352 |
| 21.5/1 | 0,269 | 0,385 | 0,381 |
| 21.6 | 0,289 | 0,355 | 0,397 |
| 22.2 | 0,245 | 0,325 | 0,354 |
| 22.5.1 | 0,288 | 0,349 | 0,397 |
| 23.2 | 0,215 | 0,345 | 0,399 |
| 23.3.1 | 0,292 | 0,353 | 0,397 |
| 31.1 | 0,253 | 0,346 | 0,376 |
| 31.2 | 0,293 | 0,314 | 0,367 |
| 31.3 | 0,294 | 0,317 | 0,373 |
| 35.1/2 | 0,103 | 0,241 | 0,373 |
| 35.2 | 0,129 | 0,335 | 0,369 |
| 35.3 | 0,253 | 0,345 | 0,376 |
| 35.5 | 0,273 | 0,356 | 0,382 |
| 35.7 | 0,278 | 0,359 | 0,393 |
| 35.8 | 0,283 | 0,352 | 0,395 |
| 36.1 | 0,293 | 0,358 | 0,398 |
| 36.2 | 0,274 | 0,357 | 0,382 |

| Strain | A 585 nm (20%) | A 585 nm (10%) | A 585 nm (5%) |
|-----------|-------------------|-------------------|------------------|
| 36.4 | 0,233 | 0,365 | 0,380 |
| 36.6/1 | 0,239 | 0,315 | 0,371 |
| 36.6/2 | 0,224 | 0,327 | 0,338 |
| 37.1 | 0,212 | 0,309 | 0,364 |
| 37.1 (II) | 0,292 | 0,336 | 0,386 |
| 35.6 | 0,266 | 0,337 | 0,381 |
| 37.2/1 | 0,246 | 0,343 | 0,378 |
| 37.2/2 | 0,235 | 0,375 | 0,382 |
| 37.3 | 0,235 | 0,354 | 0,378 |
| 37.4 | 0,295 | 0,347 | 0,358 |
| 37.6 | 0,241 | 0,325 | 0,373 |
| 37.7 | 0,244 | 0,327 | 0,374 |
| 38.4 | 0,300 | 0,318 | 0,396 |
| 39.1 | 0,238 | 0,319 | 0,386 |
| 39.2 | 0,217 | 0,365 | 0,380 |
| 39.3 | 0,297 | 0,325 | 0,358 |
| 40.3 | 0,222 | 0,313 | 0,367 |
| 40.6/2 | 0,297 | 0,338 | 0,359 |
| 27.7 | 0,205 | 0,325 | 0,366 |
| 29.2 | 0,245 | 0,322 | 0,373 |
| 32.4 | 0,235 | 0,375 | 0,382 |
| 32.5 | 0,215 | 0,355 | 0,378 |
| 32.8 | 0,228 | 0,317 | 0,369 |
| 33.1 | 0,232 | 0,311 | 0,369 |
| 33.2 | 0,227 | 0,335 | 0,372 |
| 33.3 | 0,224 | 0,318 | 0,368 |
| 33.4 | 0,238 | 0,315 | 0,371 |
| 33.5 | 0,258 | 0,324 | 0,376 |
| 33.6 | 0,296 | 0,305 | 0,362 |
| 33.7 | 0,211 | 0,355 | 0,373 |
| 33.8 | 0,239 | 0,295 | 0,359 |
| 34.1 | 0,255 | 0,325 | 0,376 |
| 34.3 | 0,291 | 0,295 | 0,357 |
| 34.4 | 0,286 | 0,29 | 0,355 |
| 34.5 | 0,208 | 0,309 | 0,363 |
| 34.7 | 0,244 | 0,262 | 0,341 |
| 27.6 | 0,243 | 0,275 | 0,344 |
| K | 0,351 | 0,351 | 0,351 |

Prilog 24. Rezultati ANOVA i post-hoc Fišcerovog LSD testa pri dodatku 5 % supernatanta *Bacillus* spp.

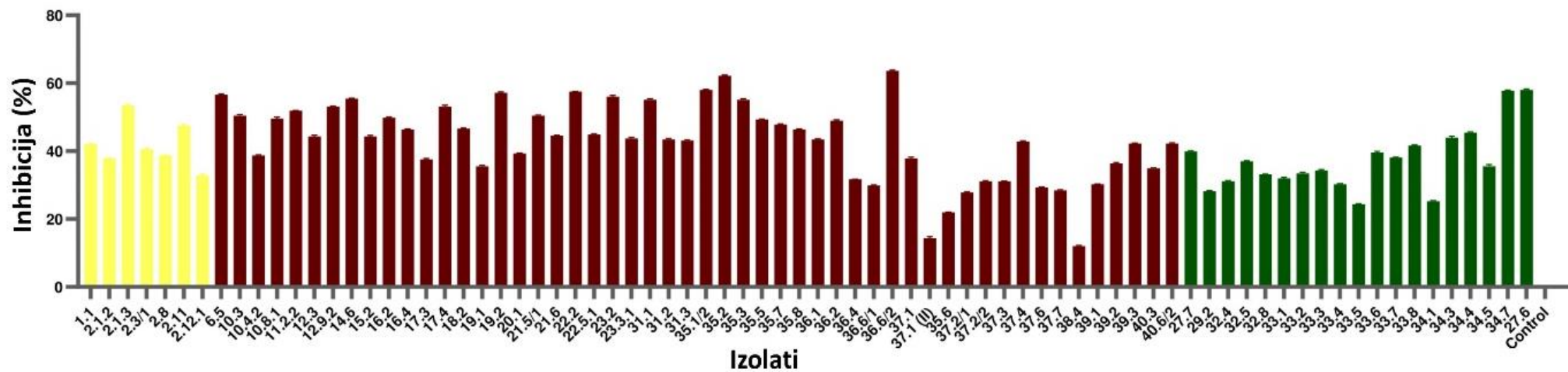
| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff | Significant? | Summary | Individual P Value | Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff | Significant? | Summary | Individual P Value |
|--------------------------|-----------|--------------|---------|--------------------|--------------------------|-----------|--------------|---------|--------------------|
| Control vs. 1.1 | -0,013 | No | ns | 0,6179 | Control vs. 36.1 | -0,047 | No | ns | 0,0727 |
| Control vs. 2.1.2 | -0,023 | No | ns | 0,3779 | Control vs. 36.2 | -0,031 | No | ns | 0,2351 |
| Control vs. 2.1.3 | -0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 36.4 | -0,029 | No | ns | 0,2665 |
| Control vs. 2.3/1 | -0,013 | No | ns | 0,6179 | Control vs. 36.6/1 | -0,02 | No | ns | 0,4431 |
| Control vs. 2.8 | -0,02 | No | ns | 0,4431 | Control vs. 36.6/2 | -0,017 | No | ns | 0,5143 |
| Control vs. 2.11 | 0,02 | No | ns | 0,4431 | Control vs. 37.1 | -0,013 | No | ns | 0,6179 |
| Control vs. 2.12.1 | 0,003 | No | ns | 0,9083 | Control vs. 37.1 (II) | -0,035 | No | ns | 0,1803 |
| Control vs. 6.5 | -0,001 | No | ns | 0,9694 | Control vs. 35.6 | -0,03 | No | ns | 0,2505 |
| Control vs. 10.3 | 0,008 | No | ns | 0,7588 | Control vs. 37.2/1 | -0,027 | No | ns | 0,3008 |
| Control vs. 10.4.2 | -0,002 | No | ns | 0,9388 | Control vs. 37.2/2 | -0,031 | No | ns | 0,2351 |
| Control vs. 10.8.1 | -0,043 | No | ns | 0,1003 | Control vs. 37.3 | -0,027 | No | ns | 0,3008 |
| Control vs. 11.2.2 | -0,008 | No | ns | 0,7588 | Control vs. 37.4 | -0,047 | No | ns | 0,0727 |
| Control vs. 12.3 | -0,034 | No | ns | 0,193 | Control vs. 37.6 | -0,022 | No | ns | 0,3989 |
| Control vs. 12.9.2 | -0,005 | No | ns | 0,8478 | Control vs. 37.7 | -0,023 | No | ns | 0,3779 |
| Control vs. 14.6 | -0,045 | No | ns | 0,0855 | Control vs. 38.4 | -0,045 | No | ns | 0,0855 |
| Control vs. 15.2 | -0,042 | No | ns | 0,1083 | Control vs. 39.1 | -0,039 | No | ns | 0,1357 |
| Control vs. 16.2 | -0,014 | No | ns | 0,5911 | Control vs. 39.2 | -0,039 | No | ns | 0,1357 |
| Control vs. 16.4 | -0,044 | No | ns | 0,0927 | Control vs. 39.3 | -0,047 | No | ns | 0,0727 |
| Control vs. 17.3 | -0,015 | No | ns | 0,5649 | Control vs. 40.3 | -0,016 | No | ns | 0,5393 |
| Control vs. 17.4 | -0,04 | No | ns | 0,1261 | Control vs. 40.6/2 | -0,048 | No | ns | 0,0668 |
| Control vs. 18.2 | -0,017 | No | ns | 0,5143 | Control vs. 27.7 | -0,015 | No | ns | 0,5649 |
| Control vs. 19.1 | 0,008 | No | ns | 0,7588 | Control vs. 29.2 | -0,022 | No | ns | 0,3989 |
| Control vs. 19.2 | -0,024 | No | ns | 0,3575 | Control vs. 32.4 | -0,031 | No | ns | 0,2351 |
| Control vs. 20.1 | -0,001 | No | ns | 0,9694 | Control vs. 32.5 | -0,027 | No | ns | 0,3008 |
| Control vs. 21.5/1 | -0,03 | No | ns | 0,2505 | Control vs. 32.8 | -0,018 | No | ns | 0,4899 |
| Control vs. 21.6 | -0,046 | No | ns | 0,0789 | Control vs. 33.1 | -0,018 | No | ns | 0,4899 |
| Control vs. 22.2 | -0,003 | No | ns | 0,9083 | Control vs. 33.2 | -0,021 | No | ns | 0,4206 |
| Control vs. 22.5.1 | -0,046 | No | ns | 0,0789 | Control vs. 33.3 | -0,017 | No | ns | 0,5143 |
| Control vs. 23.2 | -0,048 | No | ns | 0,0668 | Control vs. 33.4 | -0,02 | No | ns | 0,4431 |
| Control vs. 23.3.1 | -0,046 | No | ns | 0,0789 | Control vs. 33.5 | -0,025 | No | ns | 0,3379 |
| Control vs. 31.1 | -0,025 | No | ns | 0,3379 | Control vs. 33.6 | -0,011 | No | ns | 0,6729 |
| Control vs. 31.2 | -0,016 | No | ns | 0,5393 | Control vs. 33.7 | -0,022 | No | ns | 0,3989 |
| Control vs. 31.3 | -0,022 | No | ns | 0,3989 | Control vs. 33.8 | -0,048 | No | ns | 0,0668 |
| Control vs. 35.1/2 | -0,022 | No | ns | 0,3989 | Control vs. 34.1 | -0,025 | No | ns | 0,3379 |
| Control vs. 35.2 | -0,018 | No | ns | 0,4899 | Control vs. 34.3 | -0,046 | No | ns | 0,0789 |
| Control vs. 35.3 | -0,025 | No | ns | 0,3379 | Control vs. 34.4 | -0,004 | No | ns | 0,878 |
| Control vs. 35.5 | -0,031 | No | ns | 0,2351 | Control vs. 34.5 | -0,012 | No | ns | 0,6452 |
| Control vs. 35.7 | -0,042 | No | ns | 0,1083 | Control vs. 34.7 | -0,021 | No | ns | 0,4206 |
| Control vs. 35.8 | -0,044 | No | ns | 0,0927 | Control vs. 27.6 | -0,023 | No | ns | 0,3779 |

Prilog 25. Rezultati ANOVA i post-hoc Fišerovog LSD testa pri dodatku 10 % supernatanta *Bacillus* spp. Žuto obeležene vrednosti su pokazale značajnu razliku u apsorbanci u odnosu na kontrolu.

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff | Significant? | Summary | Individual P Value | Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff | Significant? | Summary | Individual P Value |
|--------------------------|-----------|--------------|---------|--------------------|--------------------------|-----------|--------------|---------|--------------------|
| Control vs. 1.1 | 0,039 | No | ns | 0,1357 | Control vs. 36.1 | 0,003 | No | ns | 0,9083 |
| Control vs. 2.1.2 | 0,001 | No | ns | 0,9694 | Control vs. 36.2 | 0,014 | No | ns | 0,5911 |
| Control vs. 2.1.3 | 0,126 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 36.4 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 2.3/1 | 0,036 | No | ns | 0,1683 | Control vs. 36.6/1 | 0,036 | No | ns | 0,1683 |
| Control vs. 2.8 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 36.6/2 | 0,114 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 2.11 | 0,106 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 37.1 | 0,042 | No | ns | 0,1083 |
| Control vs. 2.12.1 | 0,016 | No | ns | 0,5393 | Control vs. 37.1 (II) | 0,015 | No | ns | 0,5649 |
| Control vs. 6.5 | 0,137 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 35.6 | 0,014 | No | ns | 0,5911 |
| Control vs. 10.3 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 37.2/1 | 0,008 | No | ns | 0,7588 |
| Control vs. 10.4.2 | 0,016 | No | ns | 0,5393 | Control vs. 37.2/2 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 10.8.1 | 0,005 | No | ns | 0,8478 | Control vs. 37.3 | 0,017 | No | ns | 0,5143 |
| Control vs. 11.2.2 | 0,019 | No | ns | 0,4662 | Control vs. 37.4 | 0,004 | No | ns | 0,878 |
| Control vs. 12.3 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 37.6 | 0,026 | No | ns | 0,319 |
| Control vs. 12.9.2 | 0,039 | No | ns | 0,1357 | Control vs. 37.7 | 0,024 | No | ns | 0,3575 |
| Control vs. 14.6 | 0,005 | No | ns | 0,8478 | Control vs. 38.4 | 0,011 | No | ns | 0,6729 |
| Control vs. 15.2 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 39.1 | 0,005 | No | ns | 0,8478 |
| Control vs. 16.2 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 39.2 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 16.4 | 0,001 | No | ns | 0,9694 | Control vs. 39.3 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 17.3 | 0,016 | No | ns | 0,5393 | Control vs. 40.3 | 0,038 | No | ns | 0,146 |
| Control vs. 17.4 | 0,097 | Yes | *** | 0,0003 | Control vs. 40.6/2 | 0,013 | No | ns | 0,6179 |
| Control vs. 18.2 | 0,035 | No | ns | 0,1803 | Control vs. 27.7 | 0,126 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 19.1 | 0,018 | No | ns | 0,4899 | Control vs. 29.2 | 0,029 | No | ns | 0,2665 |
| Control vs. 19.2 | 0,003 | No | ns | 0,9083 | Control vs. 32.4 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 20.1 | 0,026 | No | ns | 0,319 | Control vs. 32.5 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 21.5/1 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 32.8 | 0,034 | No | ns | 0,193 |
| Control vs. 21.6 | 0,016 | No | ns | 0,5393 | Control vs. 33.1 | 0,04 | No | ns | 0,1261 |
| Control vs. 22.2 | 0,026 | No | ns | 0,319 | Control vs. 33.2 | 0,016 | No | ns | 0,5393 |
| Control vs. 22.5.1 | 0,002 | No | ns | 0,9388 | Control vs. 33.3 | 0,033 | No | ns | 0,2064 |
| Control vs. 23.2 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 33.4 | 0,036 | No | ns | 0,1683 |
| Control vs. 23.3.1 | 0,008 | No | ns | 0,7588 | Control vs. 33.5 | 0,027 | No | ns | 0,3008 |
| Control vs. 31.1 | 0,005 | No | ns | 0,8478 | Control vs. 33.6 | 0,046 | No | ns | 0,0789 |
| Control vs. 31.2 | 0,037 | No | ns | 0,1568 | Control vs. 33.7 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 31.3 | 0,034 | No | ns | 0,193 | Control vs. 33.8 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 35.1/2 | 0,11 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 34.1 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 35.2 | 0,116 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 34.3 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |
| Control vs. 35.3 | 0,006 | No | ns | 0,8179 | Control vs. 34.4 | 0,042 | No | ns | 0,1083 |
| Control vs. 35.5 | 0,005 | No | ns | 0,8478 | Control vs. 34.5 | 0,042 | No | ns | 0,1083 |
| Control vs. 35.7 | 0,002 | No | ns | 0,9388 | Control vs. 34.7 | 0,029 | No | ns | 0,2665 |
| Control vs. 35.8 | 0,009 | No | ns | 0,7298 | Control vs. 27.6 | 0,006 | No | ns | 0,8179 |

Prilog 26. Rezultati ANOVA i post-hoc Fišerovog LSD testa pri dodatku 20 % supernatanta *Bacillus* spp. Žuto obeležene vrednosti su pokazale značajnu razliku u apsorbanci u odnosu na kontrolu.

| Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff | Significant? | Summary | Individual P Value | Uncorrected Fisher's LSD | Mean Diff | Significant? | Summary | Individual P Value |
|--------------------------|-----------|--------------|---------|--------------------|--------------------------|-----------|--------------|---------|--------------------|
| Control vs. 1.1 | 0,053 | Yes | * | 0,0432 | Control vs. 36.1 | 0,058 | Yes | * | 0,0272 |
| Control vs. 2.1.2 | 0,139 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 36.2 | 0,077 | Yes | ** | 0,0035 |
| Control vs. 2.1.3 | 0,242 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 36.4 | 0,118 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 2.3/1 | 0,148 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 36.6/1 | 0,112 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 2.8 | 0,042 | No | ns | 0,1083 | Control vs. 36.6/2 | 0,252 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 2.11 | 0,246 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 37.1 | 0,139 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 2.12.1 | 0,132 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 37.1 (II) | 0,059 | Yes | * | 0,0247 |
| Control vs. 6.5 | 0,233 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 35.6 | 0,085 | Yes | ** | 0,0013 |
| Control vs. 10.3 | 0,082 | Yes | ** | 0,0019 | Control vs. 37.2/1 | 0,105 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 10.4.2 | 0,142 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 37.2/2 | 0,116 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 10.8.1 | 0,079 | Yes | ** | 0,0028 | Control vs. 37.3 | 0,116 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 11.2.2 | 0,087 | Yes | ** | 0,001 | Control vs. 37.4 | 0,056 | Yes | * | 0,0328 |
| Control vs. 12.3 | 0,061 | Yes | * | 0,0203 | Control vs. 37.6 | 0,11 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 12.9.2 | 0,091 | Yes | *** | 0,0006 | Control vs. 37.7 | 0,107 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 14.6 | 0,099 | Yes | *** | 0,0002 | Control vs. 38.4 | 0,051 | No | ns | 0,0517 |
| Control vs. 15.2 | 0,132 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 39.1 | 0,113 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 16.2 | 0,08 | Yes | ** | 0,0025 | Control vs. 39.2 | 0,134 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 16.4 | 0,068 | Yes | ** | 0,0098 | Control vs. 39.3 | 0,054 | Yes | * | 0,0395 |
| Control vs. 17.3 | 0,138 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 40.3 | 0,129 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 17.4 | 0,245 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 40.6/2 | 0,054 | Yes | * | 0,0395 |
| Control vs. 18.2 | 0,069 | Yes | ** | 0,0088 | Control vs. 27.7 | 0,246 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 19.1 | 0,131 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 29.2 | 0,106 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 19.2 | 0,105 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 32.4 | 0,116 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 20.1 | 0,144 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 32.5 | 0,136 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 21.5/1 | 0,082 | Yes | ** | 0,0019 | Control vs. 32.8 | 0,123 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 21.6 | 0,062 | Yes | * | 0,0183 | Control vs. 33.1 | 0,119 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 22.2 | 0,106 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 33.2 | 0,124 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 22.5.1 | 0,063 | Yes | * | 0,0166 | Control vs. 33.3 | 0,127 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 23.2 | 0,136 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 33.4 | 0,113 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 23.3.1 | 0,059 | Yes | * | 0,0247 | Control vs. 33.5 | 0,093 | Yes | *** | 0,0005 |
| Control vs. 31.1 | 0,098 | Yes | *** | 0,0002 | Control vs. 33.6 | 0,145 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 31.2 | 0,058 | Yes | * | 0,0272 | Control vs. 33.7 | 0,14 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 31.3 | 0,057 | Yes | * | 0,0299 | Control vs. 33.8 | 0,052 | Yes | * | 0,0473 |
| Control vs. 35.1/2 | 0,248 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 34.1 | 0,096 | Yes | *** | 0,0003 |
| Control vs. 35.2 | 0,222 | Yes | **** | <0,0001 | Control vs. 34.3 | 0,06 | Yes | * | 0,0224 |
| Control vs. 35.3 | 0,098 | Yes | *** | 0,0002 | Control vs. 34.4 | 0,065 | Yes | * | 0,0135 |
| Control vs. 35.5 | 0,078 | Yes | ** | 0,0031 | Control vs. 34.5 | 0,143 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 35.7 | 0,073 | Yes | ** | 0,0056 | Control vs. 34.7 | 0,107 | Yes | **** | <0,0001 |
| Control vs. 35.8 | 0,068 | Yes | ** | 0,0098 | Control vs. 27.6 | 0,108 | Yes | **** | <0,0001 |



Prilog 27. Prikaz procenta inhibicije sinteze violaceina pri dodatku 20% supernatanta. Žuto obeleženi su izolati iz sena/slame, creveno iz zemljišta i zeleno iz stajskog đubriva.

Prilog 28.1 Brojnost SS-38.4 populacije u filozferi šećerne repe 24 sata nakon introdukcije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost) i molekularnom metodom ddPCR (apsolutna brojnost).

| Relativna brojnost SS-38.4 24 h nakon introdukcije | | | | | | | | |
|--|-----------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml (NA) | CFU/ml (Bchr) | SV (NA + Bchr) | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| K1(38.4.1)1 | 55,221 | 27,6105 | 50 | 740 | 0 | 370 | 670,0349505 | 2,826097457 |
| K2(38.4.1)1 | 73,462 | 36,731 | 50 | 4840 | 270 | 2555 | 3477,98862 | 3,541328157 |
| K3(38.4.1)1 | 92,136 | 46,068 | 50 | 2200 | 930 | 1565 | 1698,576018 | 3,230084988 |
| S1(T1)1 | 15,6882 | 7,8441 | 50 | 650 | 0 | 325 | 2071,620709 | 3,316310244 |
| S2(T1)1 | 63,607 | 31,8035 | 50 | 6520 | 100 | 3310 | 5203,829767 | 3,716323081 |
| S3(T1)1 | 68,048 | 34,024 | 50 | 980 | 120 | 550 | 808,2529979 | 2,907547324 |
| S1(T2)1 | 68,764 | 34,382 | 50 | 1340 | 190 | 765 | 1112,500727 | 3,046300304 |
| S2(T2)1 | 54,512 | 27,256 | 50 | 1210 | 230 | 720 | 1320,810097 | 3,12084038 |
| S3(T2)1 | 84,925 | 42,4625 | 50 | 2060 | 0 | 1030 | 1212,834854 | 3,083801669 |
| Apsolutna brojnost SS-38.4 24 h nakon introdukcije | | | | | | | | |
| Tretman | m (polovine lista mg) | m (mg lista po reakciji) | V (DNA rastv. µl) | kopija/µl (20 µl uzorka) | kopija/µl (100 µl uzorka) | Br. bakterija | LOG (Br. bakterija) | |
| S1(38.4.1)1 | 631 | 80 | 100 | 7,22 | 36,1 | 284,73875 | 2,454446574 | |
| S2(38.4.1)1 | 693 | 80 | 100 | 134,01 | 670,05 | 5804,308125 | 3,763750459 | |
| S3(38.4.1)1 | 851 | 80 | 100 | 97,42 | 487,1 | 5181,52625 | 3,714457703 | |
| S1(T1)1 | 204 | 80 | 100 | 92,18 | 460,9 | 1175,295 | 3,070146889 | |
| S2(T1)1 | 652 | 80 | 100 | 124,205 | 621,025 | 5061,35375 | 3,704266692 | |
| S3(T1)1 | 640 | 80 | 100 | 11,38 | 56,9 | 455,2 | 2,658202253 | |
| S1(T2)1 | 647 | 80 | 100 | 80,825 | 404,125 | 3268,360938 | 3,514330011 | |
| S2(T2)1 | 623 | 80 | 100 | 37,245 | 186,225 | 1450,227188 | 3,161436043 | |
| S3(T2)1 | 738 | 80 | 100 | 26,275 | 131,375 | 1211,934375 | 3,083479104 | |

Prilog 28.2 Brojnost SS-38.4 populacije u filosferi šećerne repe 5 dana nakon introdukcije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost) i molekularnom metodom ddPCR (apsolutna brojnost).

| Relativna brojnost SS-38.4 5 dana nakon introdukcije | | | | | | | | |
|--|-----------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml (NA) | CFU/ml (Bchr) | SV (NA + Bchr) | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| S1(38.4.1)1 | 46,385 | 23,1925 | 50 | 1290 | 100 | 695 | 1498,329201 | 3,175607244 |
| S2(38.4.1)1 | 71,326 | 35,663 | 50 | 4900 | 0 | 2450 | 3434,932563 | 3,535918215 |
| S3(38.4.1)1 | 78,331 | 39,1655 | 50 | 5300 | 140 | 2720 | 3472,44386 | 3,540635233 |
| S1(T1)1 | 55,474 | 27,737 | 50 | 3300 | 90 | 1695 | 3055,485453 | 3,48508022 |
| S2(T1)1 | 52,029 | 26,0145 | 50 | 2400 | 190 | 1295 | 2488,996521 | 3,39602429 |
| S3(T1)1 | 58,599 | 29,2995 | 50 | 1310 | 0 | 655 | 1117,766515 | 3,048351095 |
| S1(T2)1 | 44,757 | 22,3785 | 50 | 3100 | 0 | 1550 | 3463,14543 | 3,539470729 |
| S2(T2)1 | 49,879 | 24,9395 | 50 | 900 | 0 | 450 | 902,1832835 | 2,955294776 |
| S3(T2)1 | 46,031 | 23,0155 | 50 | 5000 | 0 | 2500 | 5431,122504 | 3,734889599 |
| Apsolutna brojnost SS-38.4 5 dana nakon introdukcije | | | | | | | | |
| Tretman | m (polovine lista mg) | m (mg lista po reakciji) | V (DNA rastv. µl) | kopija/µl (20 µl uzorka) | kopija/µl (100 µl uzorka) | Br. bakterija | LOG (Br. bakterija) | |
| S1(38.4.1)1 | 610 | 80 | 100 | 25,105 | 125,525 | 957,128125 | 2,980970078 | |
| S2(38.4.1)1 | 729 | 80 | 100 | 33,525 | 167,625 | 1527,482813 | 3,183976332 | |
| S3(38.4.1)1 | 745 | 80 | 100 | 141,305 | 706,525 | 6579,514063 | 3,818193819 | |
| S1(T1)1 | 628 | 80 | 100 | 1,815 | 9,075 | 71,23875 | 1,85271629 | |
| S2(T1)1 | 616 | 80 | 100 | 145,28 | 726,4 | 5593,28 | 3,747666561 | |
| S3(T1)1 | 695 | 80 | 100 | 67,05 | 335,25 | 2912,484375 | 3,464263604 | |
| S1(T2)1 | 601 | 80 | 100 | 148,215 | 741,075 | 5567,325938 | 3,745646648 | |
| S2(T2)1 | 597 | 80 | 100 | 38,41 | 192,05 | 1433,173125 | 3,156298656 | |
| S3(T2)1 | 586 | 80 | 100 | 477,845 | 2389,225 | 17501,07313 | 4,243064679 | |

Prilog 28.3 Brojnost SS-38.4 populacije u filosferi šećerne repe 7 dana nakon introdukcije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost) i molekularnom metodom ddPCR (apsolutna brojnost).

| Relativna brojnost SS-38.4 7 dana nakon introdukcije | | | | | | | | |
|--|-----------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml (NA) | CFU/ml (Bchr) | SV (NA + Bchr) | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| S1(38.4.1)1 | 57,784 | 28,892 | 50 | 3960 | 490 | 2225 | 3850,546864 | 3,585522413 |
| S2(38.4.1)1 | 70,78 | 35,39 | 50 | 530 | 90 | 310 | 437,9768296 | 2,641451136 |
| S3(38.4.1)1 | 44,211 | 22,1055 | 50 | 1500 | 960 | 1230 | 2782,113049 | 3,444374773 |
| S1(T1)1 | 56,155 | 28,0775 | 50 | 1860 | 580 | 1220 | 2172,558098 | 3,336971399 |
| S2(T1)1 | 51,135 | 25,5675 | 50 | 1980 | 120 | 1050 | 2053,38809 | 3,312471039 |
| S3(T1)1 | 51,738 | 25,869 | 50 | 1920 | 1030 | 1475 | 2850,902625 | 3,454982384 |
| S1(T2)1 | 25,395 | 12,6975 | 50 | 970 | 180 | 575 | 2264,225241 | 3,354919628 |
| S2(T2)1 | 73,055 | 36,5275 | 50 | 1800 | 260 | 1030 | 1409,896653 | 3,14918728 |
| S3(T2)1 | 56,671 | 28,3355 | 50 | 390 | 130 | 260 | 458,7884456 | 2,661612472 |
| Apsolutna brojnost SS-38.4 7 dana nakon introdukcije | | | | | | | | |
| Tretman | m (polovine lista mg) | m (mg lista po reakciji) | V (DNA rastv. µl) | kopija/µl (20 µl uzorka) | kopija/µl (100 µl uzorka) | Br. bakterija | LOG (Br. bakterija) | |
| S1(38.4.1)1 | 641 | 80 | 100 | 111,855 | 559,275 | 4481,190938 | 3,651393449 | |
| S2(38.4.1)1 | 723 | 80 | 100 | 5,815 | 29,075 | 262,7653125 | 2,419568034 | |
| S3(38.4.1)1 | 599 | 80 | 100 | 16,715 | 83,575 | 625,7678125 | 2,796413221 | |
| S1(T1)1 | 674 | 80 | 100 | 102,825 | 514,125 | 4331,503125 | 3,636638632 | |
| S2(T1)1 | 652 | 80 | 100 | 16,68 | 83,4 | 679,71 | 2,832323659 | |
| S3(T1)1 | 657 | 80 | 100 | 51,54 | 257,7 | 2116,36125 | 3,325589801 | |
| S1(T2)1 | 369 | 80 | 100 | 28,9 | 144,5 | 666,50625 | 2,823804226 | |
| S2(T2)1 | 744 | 80 | 100 | 44,995 | 224,975 | 2092,2675 | 3,320617209 | |
| S3(T2)1 | 655 | 80 | 100 | 13,855 | 69,275 | 567,1890625 | 2,753727847 | |

Prilog 28.4 Brojnost SS-38.4 populacije u filosferi šećerne repe 14 dana nakon introdukcije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost) i molekularnom metodom ddPCR (apsolutna brojnost).

| Relativna brojnost SS-38.4 5 dana nakon introdukcije | | | | | | | | |
|--|-----------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml (NA) | CFU/ml (Bchr) | SV (NA + Bchr) | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| S1(38.4.1)1 | 36,04 | 18,02 | 50 | 0 | 30 | 15 | 41,62042175 | 1,619306477 |
| S2(38.4.1)1 | 41,46 | 20,73 | 50 | 0 | 30 | 15 | 36,17945007 | 1,558461961 |
| S3(38.4.1)1 | 35,99 | 17,995 | 50 | 0 | 40 | 20 | 55,57099194 | 1,744848149 |
| S1(T1)1 | 48,05066667 | 24,02533333 | 50 | 230 | 190 | 210 | 437,0386814 | 2,640519877 |
| S2(T1)1 | 47,974 | 23,987 | 50 | 0 | 160 | 80 | 166,7569934 | 2,222084056 |
| S3(T1)1 | 48,52733333 | 24,26366667 | 50 | 0 | 190 | 95 | 195,7659601 | 2,291737179 |
| S1(T2)1 | 35,396 | 17,698 | 50 | 230 | 0 | 115 | 324,8954684 | 2,511743654 |
| S2(T2)1 | 33,81033333 | 16,90516667 | 50 | 10 | 0 | 5 | 14,78837831 | 1,169920552 |
| S3(T2)1 | 42,761 | 21,3805 | 50 | 10 | 0 | 5 | 11,69289773 | 1,067922151 |
| Apsolutna brojnost SS-38.4 7 dana nakon introdukcije | | | | | | | | |
| Tretman | m (polovine lista mg) | m (mg lista po reakciji) | V (DNA rastv. µl) | kopija/µl (20 µl uzorka) | kopija/µl (100 µl uzorka) | Br. bakterija | LOG (Br. bakterija) | |
| S1(38.4.1)1 | 319 | 80 | 100 | 2,17 | 10,85 | 43,264375 | 1,636130434 | |
| S2(38.4.1)1 | 578 | 80 | 100 | 2,29 | 11,45 | 82,72625 | 1,917643338 | |
| S3(38.4.1)1 | 321 | 80 | 100 | 3,83 | 19,15 | 76,839375 | 1,885583824 | |
| S1(T1)1 | 594 | 80 | 100 | 2,99 | 14,95 | 111,00375 | 2,045337651 | |
| S2(T1)1 | 590 | 80 | 100 | 1,52 | 7,6 | 56,05 | 1,748575617 | |
| S3(T1)1 | 588 | 80 | 100 | 19,895 | 99,475 | 731,14125 | 2,864001287 | |
| S1(T2)1 | 307 | 80 | 100 | 17,685 | 88,425 | 339,3309375 | 2,530623457 | |
| S2(T2)1 | 311 | 80 | 100 | 2,5 | 12,5 | 48,59375 | 1,686580415 | |
| S3(T2)1 | 583 | 80 | 100 | 4,735 | 23,675 | 172,5315625 | 2,236868555 | |

Prilog 29. Pirsonov koeficijent korelacije između brojnosti populacije SS-38.4 izražene preko CFU/cm² i dobijene ddPCR metodom.

| KONTROLA | | | TRETMAN 1 | | | TRETMAN 2 | | |
|---------------------------|---------------------|-------------|---------------------------|---------------------|-------------|---------------------------|---------------------|-------------|
| Pirsonov koeficijent r | | | Pirsonov koeficijent r | | | Pirsonov koeficijent r | | |
| r | | 0,9764 | r | | 0,9889 | r | | 0,9535 |
| 95% interval poverenja | 0,2478 to 0,9995 | | 95% interval poverenja | 0,5595 to 0,9998 | | 95% interval poverenja | -0,09070 to 0,9991 | |
| R na kvadrat | | 0,9533 | R na kvadrat | | 0,9778 | R na kvadrat | | 0,9092 |
| P vrednost | | | P vrednost | | | P vrednost | | |
| P (dvosmerni test) | | 0,0236 | P (dvosmerni test) | | 0,0111 | P (dvosmerni test) | | 0,0465 |
| P vrednost sumirano | * | | P vrednost sumirano | * | | P vrednost sumirano | * | |
| Značajnost? (alfa = 0.05) | DA | | Značajnost? (alfa = 0.05) | DA | | Značajnost? (alfa = 0.05) | DA | |
| Broj XY parova | | | Broj XY parova | | | Broj XY parova | | |
| | | 4 | | | 4 | | | 4 |
| | CFU/cm ² | ddPCR | | CFU/cm ² | ddPCR | | CFU/cm ² | ddPCR |
| | 3,199226849 | 3,310884912 | | 3,313480994 | 3,144205278 | | 3,076867926 | 3,253081719 |
| | 3,402804191 | 3,32771341 | | 3,294893775 | 3,021548818 | | 3,409885035 | 3,715003328 |
| | 3,223782774 | 2,955791568 | | 3,368141607 | 3,264850697 | | 3,055239793 | 2,966049761 |
| | 1,640872196 | 1,813119199 | | 2,384780371 | 2,219304852 | | 1,583195452 | 2,151357476 |

Prilog 30.1 Brojnost P21 populacije u filosferi šećerne repe 24 h nakon inokulacije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost).

| Relativna brojnost P21 24 h nakon inokulacije | | | | | | |
|---|-----------|-------------|---------|--------|-------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| K1(P21)1 | 56,253 | 28,1265 | 50 | 20200 | 35909,19595 | 4,555205681 |
| K2(P21)1 | 60,698 | 30,349 | 50 | 16600 | 27348,51231 | 4,436933707 |
| K3(P21)1 | 38,16 | 19,08 | 50 | 9500 | 24895,1782 | 4,396115239 |
| S1(T1)1 | 63,607 | 31,8035 | 50 | 6700 | 10533,43185 | 4,02256989 |
| S2(T1)1 | 86,882 | 43,441 | 50 | 7800 | 8977,693884 | 3,953164793 |
| S3(T1)1 | 68,048 | 34,024 | 50 | 7700 | 11315,54197 | 4,05367536 |
| S1(T2)1 | 68,764 | 34,382 | 50 | 8200 | 11924,8444 | 4,076452721 |
| S2(T2)1 | 54,512 | 27,256 | 50 | 8300 | 15226,00528 | 4,182585976 |
| S3(T2)1 | 84,925 | 42,4625 | 50 | 8600 | 10126,58228 | 4,005462896 |

Prilog 30.2 Brojnost P21 populacije u filosferi šećerne repe 5 dana nakon inokulacije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost).

| Relativna brojnost P21 5 dana nakon inokulacije | | | | | | |
|---|-----------|-------------|---------|--------|-------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| S1(P21)1 | 62,395 | 31,1975 | 50 | 28900 | 46317,81393 | 4,665748054 |
| S2(P21)1 | 62,623 | 31,3115 | 50 | 34900 | 55730,32272 | 4,746091558 |
| S3(P21)1 | 46,359 | 23,1795 | 50 | 22400 | 48318,55735 | 4,684113959 |
| S1(T1)1 | 55,474 | 27,737 | 50 | 130 | 234,344017 | 2,36985387 |
| S2(T1)1 | 52,029 | 26,0145 | 50 | 700 | 1345,403525 | 3,128852561 |
| S3(T1)1 | 58,599 | 29,2995 | 50 | 330 | 563,1495418 | 2,750623735 |
| S1(T2)1 | 44,757 | 22,3785 | 50 | 2300 | 5138,86096 | 3,710866867 |
| S2(T2)1 | 49,879 | 24,9395 | 50 | 1800 | 3608,733134 | 3,557354767 |
| S3(T2)3 | 46,031 | 23,0155 | 50 | 4300 | 9341,530708 | 3,970418046 |

Prilog 30.3 Brojnost P21 populacije u filosferi šećerne repe 7 dana nakon inokulacije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost).

| Relativna brojnost P21 7 dana nakon inokulacije | | | | | | |
|---|-----------|-------------|---------|--------|-------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| S1(P21)1 | 51,809 | 25,9045 | 50 | 47000 | 90717,82895 | 4,957692648 |
| S2(P21)1 | 74,184 | 37,092 | 50 | 196000 | 264207,9155 | 5,421945825 |
| S3(P21)1 | 41,567 | 20,7835 | 50 | 104000 | 250198,4748 | 5,398284658 |
| S1(T1)1 | 41,135 | 20,5675 | 50 | 160 | 388,96317 | 2,589908481 |
| S2(T1)1 | 56,155 | 28,0775 | 50 | 270 | 480,8120381 | 2,681975333 |
| S3(T1)1 | 51,738 | 25,869 | 50 | 200 | 386,5630678 | 2,587220359 |
| S1(T2)1 | 25,395 | 12,6975 | 50 | 1600 | 6300,452845 | 3,799371765 |
| S2(T2)1 | 73,055 | 36,5275 | 50 | 1300 | 1779,481213 | 3,250293407 |
| S3(T2)1 | 56,671 | 28,3355 | 50 | 3000 | 5293,712834 | 3,723760379 |

Prilog 30.4 Brojnost P21 populacije u filosferi šećerne repe 14 dana nakon inokulacije, određena tradicionalnom mikrobiološkom metodom (relativna brojnost).

| Relativna brojnost P21 14 dana nakon inokulacije | | | | | | |
|--|-------------|-------------|---------|--------|-------------|---------------|
| Tretman | P (lista) | P (lista)/2 | V (PBS) | CFU/ml | CFU/cm2 | LOG (CFU/cm2) |
| S1(P21)1 | 36,254 | 18,127 | 50 | 5300 | 14619,07652 | 4,164919939 |
| S2(P21)1 | 47,54933333 | 23,77466667 | 50 | 1100 | 2313,386798 | 3,364248253 |
| S3(P21)1 | 44,68166667 | 22,34083333 | 50 | 900 | 2014,248946 | 3,304113145 |
| S1(T1)1 | 48,05066667 | 24,02533333 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| S2(T1)1 | 47,974 | 23,987 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| S3(T1)1 | 48,52733333 | 24,26366667 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| S1(T2)1 | 41,69833333 | 20,84916667 | 50 | 700 | 1678,72417 | 3,224979343 |
| S2(T2)1 | 33,81033333 | 16,90516667 | 50 | 400 | 1183,070265 | 3,073010539 |
| S3(T2)1 | 52,08033333 | 26,04016667 | 50 | 200 | 384,0221197 | 2,58435624 |

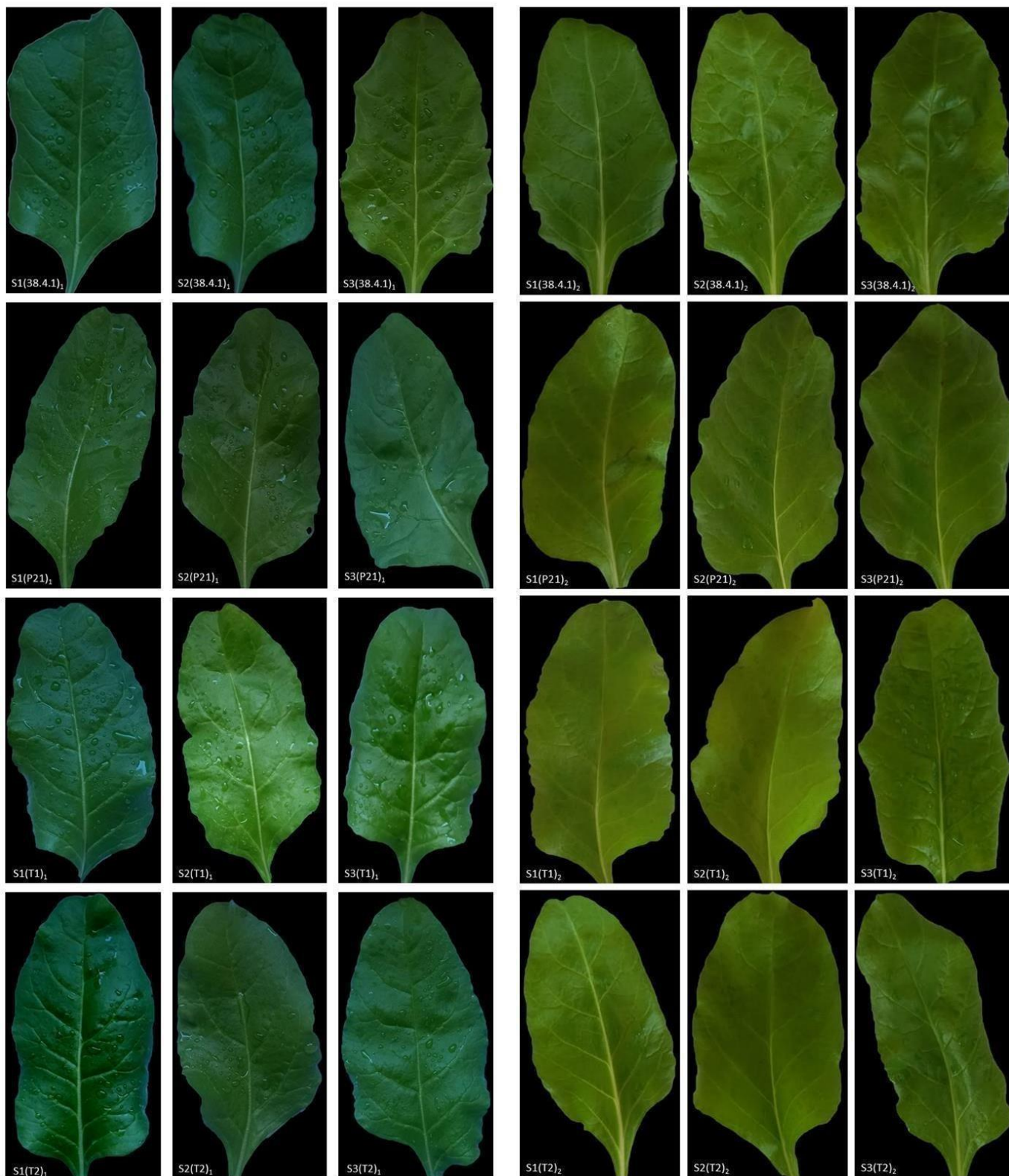
Prilog 31. Rezultati dvofaktorskog ANOVA testa primenjenog za poredenje razlika u brojnosti populacija SS-38.4 i P21.

| Analiza | | SS-38.4 i P21 CFU/cm ² komparativna analiza | | | | |
|---------------------------|-------------------------|--|------------|---------------------|---------------|--|
| Dvo-faktorska ANOVA | Ordinary | | | | | |
| Alfa | | 0,05 | | | | |
| Izvor varijabilnosti | % ukupne varijabilnosti | | P vrednost | P vrednost sumirano | Značajnostit? | |
| Interakcije | 13,64 | <0,0001 | **** | | DA | |
| Tretman | 30,89 | <0,0001 | **** | | DA | |
| Vreme | 46,95 | <0,0001 | **** | | DA | |
| ANOVA tabela | SS | DF | MS | F (DFn, DFd) | P vrednost | |
| Interakcije | 14,35 | 15 | 0,9565 | F (15, 48) = 5,121 | P<0,0001 | |
| Tretman | 32,51 | 5 | 6,501 | F (5, 48) = 34,81 | P<0,0001 | |
| Vreme | 49,4 | 3 | 16,47 | F (3, 48) = 88,16 | P<0,0001 | |
| Rezidual | 8,965 | 48 | 0,1868 | | | |
| Podaci sumirani | | | | | | |
| Broj kolona (Interakcije) | 4 | | | | | |
| Broj redova (Tretmani) | 6 | | | | | |
| Broj vrednosti | 72 | | | | | |

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95,00% CI of diff, | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|-----------------------------------|------------|--------------------|--------------|---------|------------------|
| 24 h | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | -1,264 | -2,311 to -0,2162 | Yes | ** | 0,0098 |
| K (38.4) vs. T1 (38.4) | -0,1143 | -1,162 to 0,9330 | No | ns | 0,9995 |
| K (38.4) vs. T1 (P21) | -0,8106 | -1,858 to 0,2367 | No | ns | 0,2153 |
| K (38.4) vs. T2 (38.4) | 0,1224 | -0,9249 to 1,170 | No | ns | 0,9993 |
| K (38.4) vs. T2 (P21) | -0,8889 | -1,936 to 0,1583 | No | ns | 0,1389 |
| K (P21) vs. T1 (38.4) | 1,149 | 0,1020 to 2,197 | Yes | * | 0,0239 |
| K (P21) vs. T1 (P21) | 0,4529 | -0,5943 to 1,500 | No | ns | 0,7924 |
| K (P21) vs. T2 (38.4) | 1,386 | 0,3386 to 2,433 | Yes | ** | 0,0035 |
| K (P21) vs. T2 (P21) | 0,3746 | -0,6727 to 1,422 | No | ns | 0,894 |
| T1 (38.4) vs. T1 (P21) | -0,6963 | -1,744 to 0,3510 | No | ns | 0,3723 |
| T1 (38.4) vs. T2 (38.4) | 0,2366 | -0,8107 to 1,284 | No | ns | 0,9844 |
| T1 (38.4) vs. T2 (P21) | -0,7747 | -1,822 to 0,2726 | No | ns | 0,2589 |
| T1 (P21) vs. T2 (38.4) | 0,9329 | -0,1144 to 1,980 | No | ns | 0,1064 |
| T1 (P21) vs. T2 (P21) | -0,07836 | -1,126 to 0,9689 | No | ns | >0,9999 |
| T2 (38.4) vs. T2 (P21) | -1,011 | -2,059 to 0,03599 | No | ns | 0,064 |
| 5-day | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | -1,296 | -2,343 to -0,2486 | Yes | ** | 0,0075 |
| K (38.4) vs. T1 (38.4) | 0,1079 | -0,9394 to 1,155 | No | ns | 0,9996 |

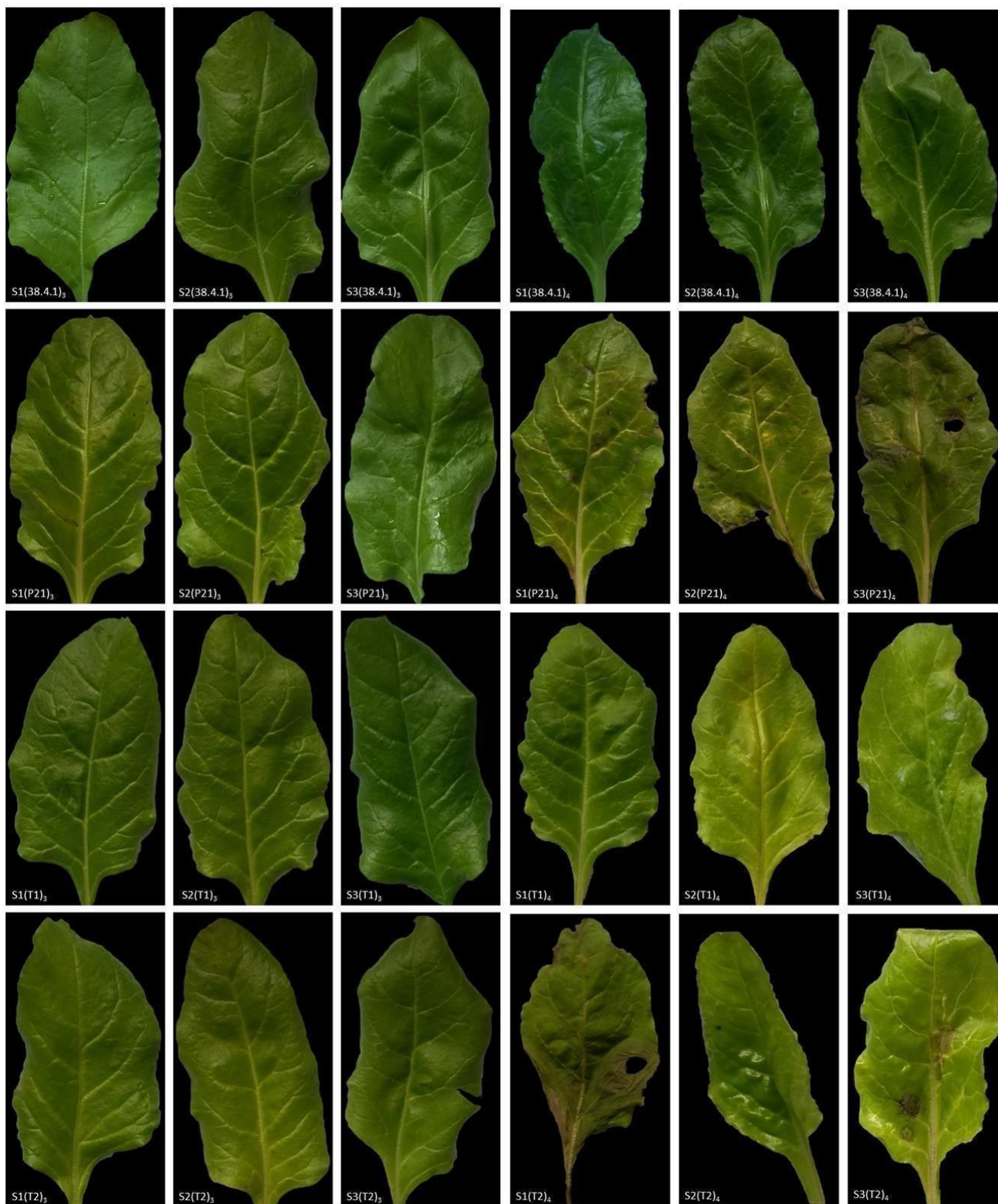
| | | | | | |
|-------------------------|-----------|-------------------|-----|------|---------|
| K (38.4) vs. T1 (P21) | 0,653 | -0,3943 to 1,700 | No | ns | 0,4443 |
| K (38.4) vs. T2 (38.4) | -0,007081 | -1,054 to 1,040 | No | ns | >0,9999 |
| K (38.4) vs. T2 (P21) | -0,3434 | -1,391 to 0,7039 | No | ns | 0,9242 |
| K (P21) vs. T1 (38.4) | 1,404 | 0,3565 to 2,451 | Yes | ** | 0,003 |
| K (P21) vs. T1 (P21) | 1,949 | 0,9016 to 2,996 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T2 (38.4) | 1,289 | 0,2415 to 2,336 | Yes | ** | 0,008 |
| K (P21) vs. T2 (P21) | 0,9524 | -0,09485 to 2,000 | No | ns | 0,0941 |
| T1 (38.4) vs. T1 (P21) | 0,5451 | -0,5022 to 1,592 | No | ns | 0,6377 |
| T1 (38.4) vs. T2 (38.4) | -0,115 | -1,162 to 0,9323 | No | ns | 0,9995 |
| T1 (38.4) vs. T2 (P21) | -0,4513 | -1,499 to 0,5960 | No | ns | 0,7948 |
| T1 (P21) vs. T2 (38.4) | -0,6601 | -1,707 to 0,3872 | No | ns | 0,4322 |
| T1 (P21) vs. T2 (P21) | -0,9964 | -2,044 to 0,05085 | No | ns | 0,0707 |
| T2 (38.4) vs. T2 (P21) | -0,3363 | -1,384 to 0,7110 | No | ns | 0,9302 |
| 7-day | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | -2,036 | -3,083 to -0,9882 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (38.4) vs. T1 (38.4) | -0,1444 | -1,192 to 0,9029 | No | ns | 0,9984 |
| K (38.4) vs. T1 (P21) | 0,6041 | -0,4432 to 1,651 | No | ns | 0,5309 |
| K (38.4) vs. T2 (38.4) | 0,1685 | -0,8787 to 1,216 | No | ns | 0,9967 |
| K (38.4) vs. T2 (P21) | -0,3674 | -1,415 to 0,6799 | No | ns | 0,9015 |
| K (P21) vs. T1 (38.4) | 1,891 | 0,8439 to 2,938 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T1 (P21) | 2,64 | 1,592 to 3,687 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T2 (38.4) | 2,204 | 1,157 to 3,251 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T2 (P21) | 1,668 | 0,6209 to 2,715 | Yes | *** | 0,0003 |
| T1 (38.4) vs. T1 (P21) | 0,7484 | -0,2988 to 1,796 | No | ns | 0,2942 |
| T1 (38.4) vs. T2 (38.4) | 0,3129 | -0,7344 to 1,360 | No | ns | 0,9479 |
| T1 (38.4) vs. T2 (P21) | -0,223 | -1,270 to 0,8243 | No | ns | 0,988 |
| T1 (P21) vs. T2 (38.4) | -0,4355 | -1,483 to 0,6117 | No | ns | 0,8179 |
| T1 (P21) vs. T2 (P21) | -0,9714 | -2,019 to 0,07585 | No | ns | 0,0833 |
| T2 (38.4) vs. T2 (P21) | -0,5359 | -1,583 to 0,5114 | No | ns | 0,6542 |
| 14-day | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | -1,97 | -3,018 to -0,9229 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (38.4) vs. T1 (38.4) | -0,7439 | -1,791 to 0,3034 | No | ns | 0,3005 |
| K (38.4) vs. T1 (P21) | 1,641 | 0,5936 to 2,688 | Yes | *** | 0,0004 |
| K (38.4) vs. T2 (38.4) | 0,05768 | -0,9896 to 1,105 | No | ns | >0,9999 |
| K (38.4) vs. T2 (P21) | 0,7794 | -0,2679 to 1,827 | No | ns | 0,2528 |
| K (P21) vs. T1 (38.4) | 1,226 | 0,1790 to 2,274 | Yes | * | 0,0132 |
| K (P21) vs. T1 (P21) | 3,611 | 2,564 to 4,658 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T2 (38.4) | 2,028 | 0,9806 to 3,075 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T2 (P21) | 2,75 | 1,702 to 3,797 | Yes | **** | <0,0001 |
| T1 (38.4) vs. T1 (P21) | 2,385 | 1,337 to 3,432 | Yes | **** | <0,0001 |
| T1 (38.4) vs. T2 (38.4) | 0,8016 | -0,2457 to 1,849 | No | ns | 0,2257 |
| T1 (38.4) vs. T2 (P21) | 1,523 | 0,4760 to 2,571 | Yes | ** | 0,0011 |
| T1 (P21) vs. T2 (38.4) | -1,583 | -2,630 to -0,5359 | Yes | *** | 0,0006 |
| T1 (P21) vs. T2 (P21) | -0,8615 | -1,909 to 0,1858 | No | ns | 0,1628 |
| T2 (38.4) vs. T2 (P21) | 0,7217 | -0,3255 to 1,769 | No | ns | 0,3329 |

Prilog 32. Biokontrolni efekat primene SS-38.4 u filosferi šećerne repe.



Slika 32.1 Fotografije listova jedan dan nakon prskanja suspenzija. Oznake S1, S2, S3 predstavljaju replikate, a tip tretmana naveden je u zagradi.

Slika 32.2 Fotografije listova peti dan nakon prskanja suspenzija. Oznake S1, S2, S3 predstavljaju replikate, a tip tretmana naveden je u zagradi.



Slika 32.3 Fotografije listova sedmi dan nakon prskanja suspenzija. Oznake S1, S2, S3 predstavljaju replikate, a tip tretmana naveden je u zagradi.

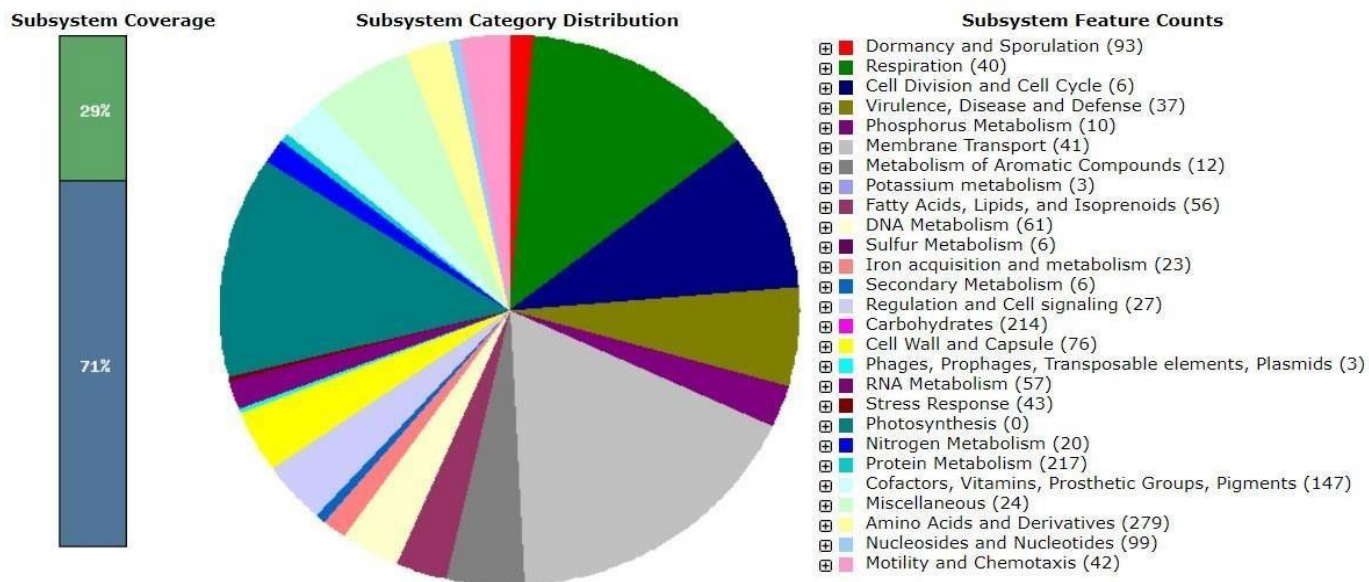
Slika 32.4 Fotografije listova 14. dan nakon prskanja suspenzija. Oznake S1, S2, S3 predstavljaju replikate, a tip tretmana naveden je u zagradi.

Prilog 33. Rezultati dvofaktorskog ANOVA testa primenjenog za poređenje razlika u biokontrolnom efektu tretmana.

| Tukey's multiple comparisons test | Mean Diff, | 95,00% CI of diff, | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
|-----------------------------------|------------|--------------------|--------------|---------|------------------|
| 24 | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | 0 | -3,003 to 3,003 | No | ns | >0,9999 |
| K (38.4) vs. T1 | 0 | -3,003 to 3,003 | No | ns | >0,9999 |
| K (38.4) vs. T2 | 0 | -3,003 to 3,003 | No | ns | >0,9999 |
| K (P21) vs. T1 | 0 | -3,003 to 3,003 | No | ns | >0,9999 |
| K (P21) vs. T2 | 0 | -3,003 to 3,003 | No | ns | >0,9999 |
| T1 vs. T2 | 0 | -3,003 to 3,003 | No | ns | >0,9999 |
| 120 | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | -2,6 | -5,603 to 0,4029 | No | ns | 0,1088 |
| K (38.4) vs. T1 | 0 | -3,003 to 3,003 | No | ns | >0,9999 |
| K (38.4) vs. T2 | -0,2667 | -3,270 to 2,736 | No | ns | 0,995 |
| K (P21) vs. T1 | 2,6 | -0,4029 to 5,603 | No | ns | 0,1088 |
| K (P21) vs. T2 | 2,333 | -0,6696 to 5,336 | No | ns | 0,1732 |
| T1 vs. T2 | -0,2667 | -3,270 to 2,736 | No | ns | 0,995 |
| 170 | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | -11 | -14,01 to -8,000 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (38.4) vs. T1 | -0,32 | -3,323 to 2,683 | No | ns | 0,9915 |
| K (38.4) vs. T2 | -1,217 | -4,220 to 1,786 | No | ns | 0,6935 |
| K (P21) vs. T1 | 10,68 | 7,680 to 13,69 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T2 | 9,787 | 6,784 to 12,79 | Yes | **** | <0,0001 |
| T1 vs. T2 | -0,8967 | -3,900 to 2,106 | No | ns | 0,8497 |
| 340 | | | | | |
| K (38.4) vs. K (P21) | -13,46 | -16,46 to -10,45 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (38.4) vs. T1 | -0,2867 | -3,290 to 2,716 | No | ns | 0,9938 |
| K (38.4) vs. T2 | -11 | -14,01 to -8,000 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T1 | 13,17 | 10,17 to 16,17 | Yes | **** | <0,0001 |
| K (P21) vs. T2 | 2,453 | -0,5496 to 5,456 | No | ns | 0,1412 |
| T1 vs. T2 | -10,72 | -13,72 to -7,714 | Yes | **** | <0,0001 |

Prilog 34. Karakteristike genoma *B. velezensis* SS-38.4

| | |
|---|------------------------------------|
| Species | <i>Bacillus velezensis</i> SS-38.4 |
| Number of contigs | 2 |
| Gene bank assembly accession number | GCA_035600155.1 |
| Gene bank chromosome accession number | JAYJLC010000001.1 |
| Genome size (bp) | 4 007 389 |
| G+C content (%) | 46.7 |
| Total genes (RAST) | 4219 |
| Total genes (PGAP) | 3965 |
| Protein-coding sequences (RAST) | 4040 |
| Protein-coding sequences (PGAP) | 3765 |
| RNA genes (RAST) | 126 |
| RNA genes (PGAP) | 132 |
| tRNA genes (RAST) | 95 |
| tRNA genes (PGAP) | 96 |
| rRNA genes (RAST) | 31 |
| rRNA genes (PGAP) | 31 |
| ncRNA (PGAP) | 5 |
| Pseudogenes (PGAP) | 68 |
| Repeat region (RAST) | 53 |
| Number of subsystems (RAST) | 323 |
| <i>Subsystem Feature Counts</i> | |
| <i>Dormancy and Sporulation</i> | 93 |
| <i>Respiration</i> | 40 |
| <i>Cell Division and Cell Cycle</i> | 6 |
| <i>Virulence, Disease and Defense</i> | 37 |
| <i>Phosphorus Metabolism</i> | 10 |
| <i>Membrane Transport</i> | 41 |
| <i>Metabolism of Aromatic Compounds</i> | 12 |
| <i>Potassium metabolism</i> | 3 |
| <i>Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids</i> | 56 |
| <i>DNA Metabolism</i> | 61 |
| <i>Sulfur Metabolism</i> | 6 |
| <i>Iron acquisition and metabolism</i> | 23 |
| <i>Secondary Metabolism</i> | 6 |
| <i>Regulation and Cell signaling</i> | 27 |
| <i>Carbohydrates</i> | 214 |
| <i>Cell Wall and Capsule</i> | 76 |
| <i>Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids</i> | 3 |
| <i>RNA Metabolism</i> | 57 |
| <i>Stress Response</i> | 43 |
| <i>Nitrogen Metabolism</i> | 20 |
| <i>Protein Metabolism</i> | 217 |
| <i>Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments</i> | 147 |
| <i>Miscellaneous</i> | 24 |
| <i>Amino Acids and Derivatives</i> | 279 |
| <i>Nucleosides and Nucleotides</i> | 99 |
| <i>Motility and Chemotaxis</i> | 42 |

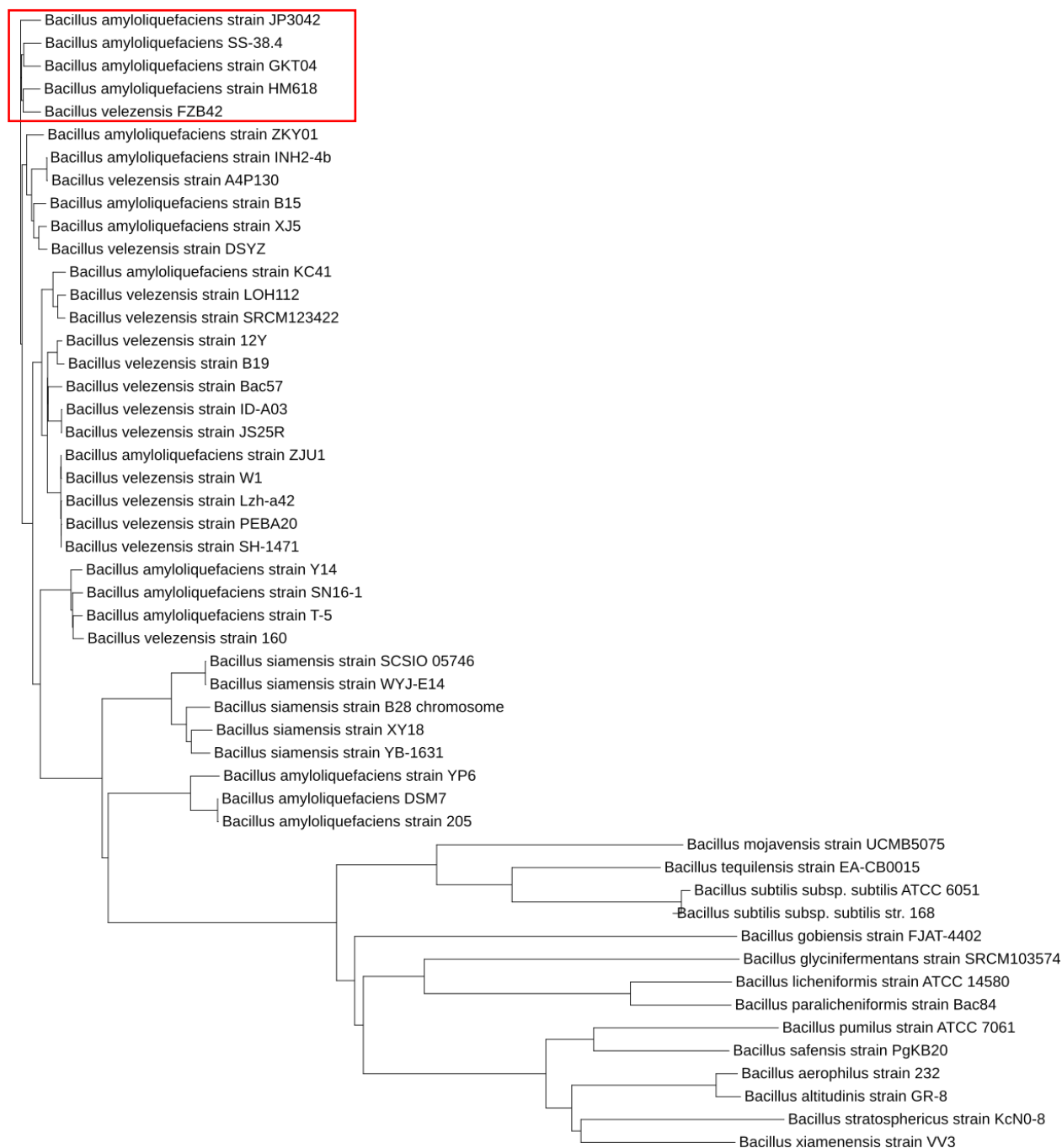


Prilog 35. Raspodela gena *B. velezensis* SS-38.4 prema funkcijskim podsistemima RAST anotacije.

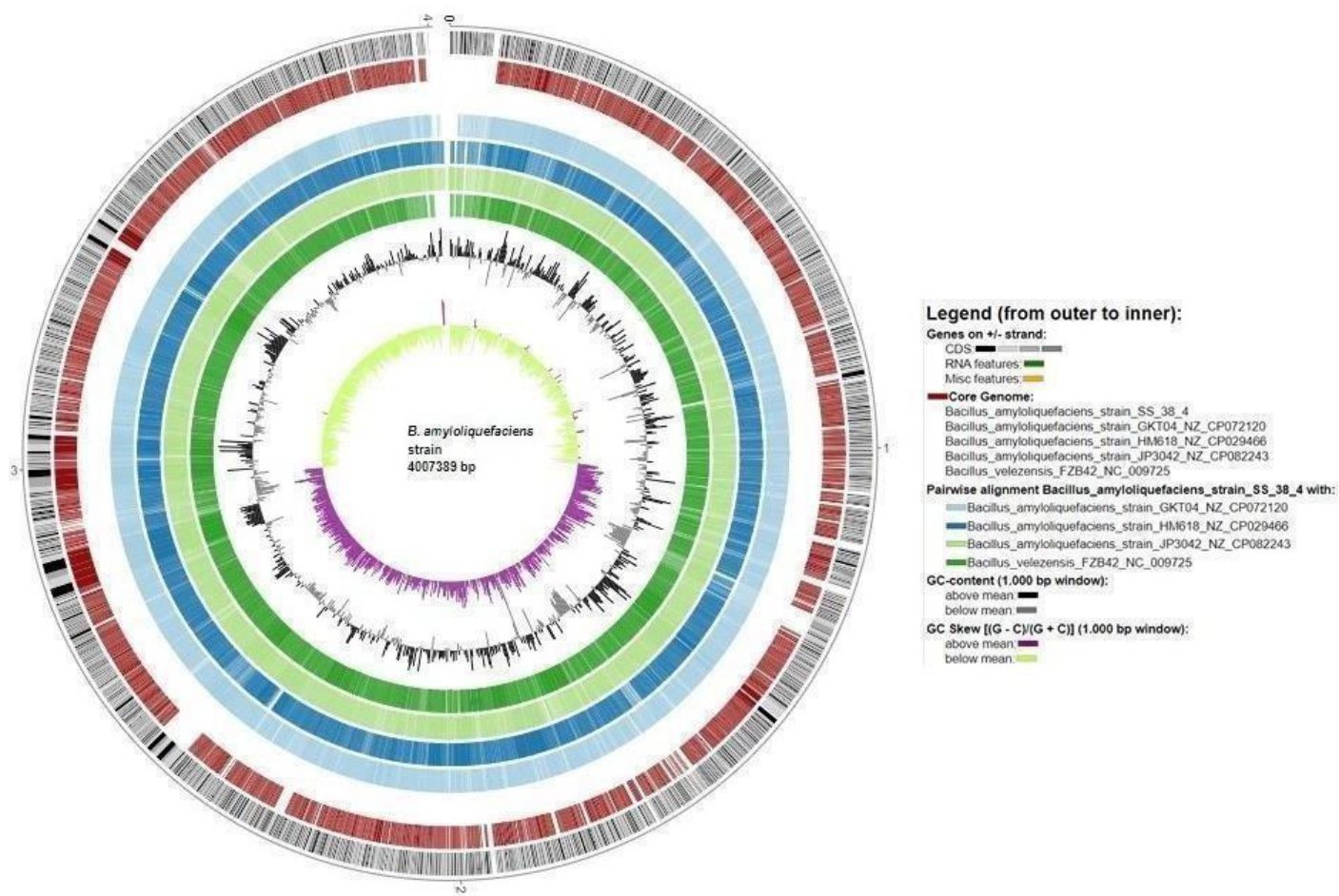
Prilog 36. Genomi korišćeni u ovom radu, sa vrednostima dDDH i ANI. Skraćenice BSSC i BAOG označavaju *Bacillus subtilis* kompleks vrsta (*B.subtilis* species complex) i Operativna grupa *Bacillus amyloliquefaciens* (Operational group *B.amyloliquefaciens*).

| Species | Strain | GenBank accession number | Genome size (bp) | GC (%) | dDDH (d ₀ %) | ANI (%) |
|---|-------------|--------------------------|------------------|--------|-------------------------|---------|
| <i>Bacillus aerophilus</i> | 232 | GCA_004101925.1 | 3,829,464 | 41.5 | 19,3 | 79 |
| <i>Bacillus altitudinis</i> | GR-8 | GCA_001191605.1 | 3,674,849 | 41.5 | 19,3 | 78 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | SS-38.4 | GCA_035600155.1 | 4,007,389 | 46.7 | 100 | 100 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | DSM7 | GCA_000196735.1 | 3,980,199 | 46.0 | 56 | 94 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 205 | GCA_013328835.1 | 4,006,790 | 46.0 | 56 | 94 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | YP6 | GCA_003868675.1 | 4,009,619 | 46.0 | 56,2 | 94 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | B15 | GCA_001596755.1 | 4,006,754 | 46.5 | 89,3 | 99 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | GKT04 | GCA_019396925.1 | 4,056,188 | 46.5 | 91,9 | 99 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | HM618 | GCA_014854735.1 | 4,021,851 | 46.5 | 90 | 99 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | INH2-4b | GCA_014791945.1 | 4,023,066 | 46.5 | 89,4 | 99 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | JP3042 | GCA_019856555.1 | 4,066,277 | 46.5 | 90,6 | 99 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | KC41 | GCA_008824205.1 | 4,118,763 | 46.0 | 84,4 | 98 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | SN16-1 | GCA_018502525.1 | 3,974,408 | 46.5 | 80,8 | 98 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | T-5 | GCA_014622745.1 | 4,036,119 | 46.5 | 81 | 98 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | XJ5 | GCA_017603845.1 | 4,160,003 | 46.0 | 89,6 | 99 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Y14 | GCA_001874385.1 | 3,957,164 | 46.5 | 80,7 | 98 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | ZJU1 | GCA_007362635.1 | 4,064,151 | 46.5 | 85,2 | 98 |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | ZKY01 | GCA_022559645.1 | 4,191,964 | 46.0 | 90,2 | 99 |
| <i>Bacillus glycinifermentans</i> | SRCM103574 | GCA_004103615.1 | 4,744,953 | 46.0 | 19,7 | 78 |
| <i>Bacillus gobiensis</i> | FJAT-4402 | GCA_001278705.1 | 4,597,707 | 40.5 | 20,7 | 79 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | ATCC 14580 | GCA_006094335.1 | 4,239,205 | 46.0 | 19,7 | 79 |
| <i>Bacillus mojavensis</i> | UCMB5075 | GCA_012648005.1 | 4,031,121 | 44.0 | 20,8 | 80 |
| <i>Bacillus paralicheniformis</i> | Bac84 | GCA_002993925.1 | 4,376,831 | 46.0 | 20,1 | 79 |
| <i>Bacillus pumilus</i> | ATCC 7061 | GCA_031316575.1 | 3,902,967 | 41.7 | 18,6 | 77 |
| <i>Bacillus safensis</i> | PgKB20 | GCA_008244765.1 | 3,786,744 | 41.5 | 20 | 79 |
| <i>Bacillus siamensis</i> | B28 | GCA_016313165.1 | 3,946,178 | 46.0 | 56,9 | 94 |
| <i>Bacillus siamensis</i> | SCSIO 05746 | GCA_002850535.1 | 4,268,316 | 46.0 | 58,1 | 94 |
| <i>Bacillus siamensis</i> | WYJ-E14 | GCA_024453785.1 | 4,020,075 | 46.0 | 58,1 | 94 |
| <i>Bacillus siamensis</i> | XY18 | GCA_000966575.1 | 3,714,066 | 46.0 | 57 | 94 |
| <i>Bacillus siamensis</i> | YB-1631 | GCA_026014025.1 | 4,090,312 | 46.0 | 57,1 | 94 |
| <i>Bacillus stratosphericus</i> | KcN0-8 | GCA_020524495.1 | 3,069,546 | 40.4 | 19 | 77 |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | ATCC 6051 | GCA_031316525.1 | 4,264,639 | 43.2 | 20,5 | 80 |

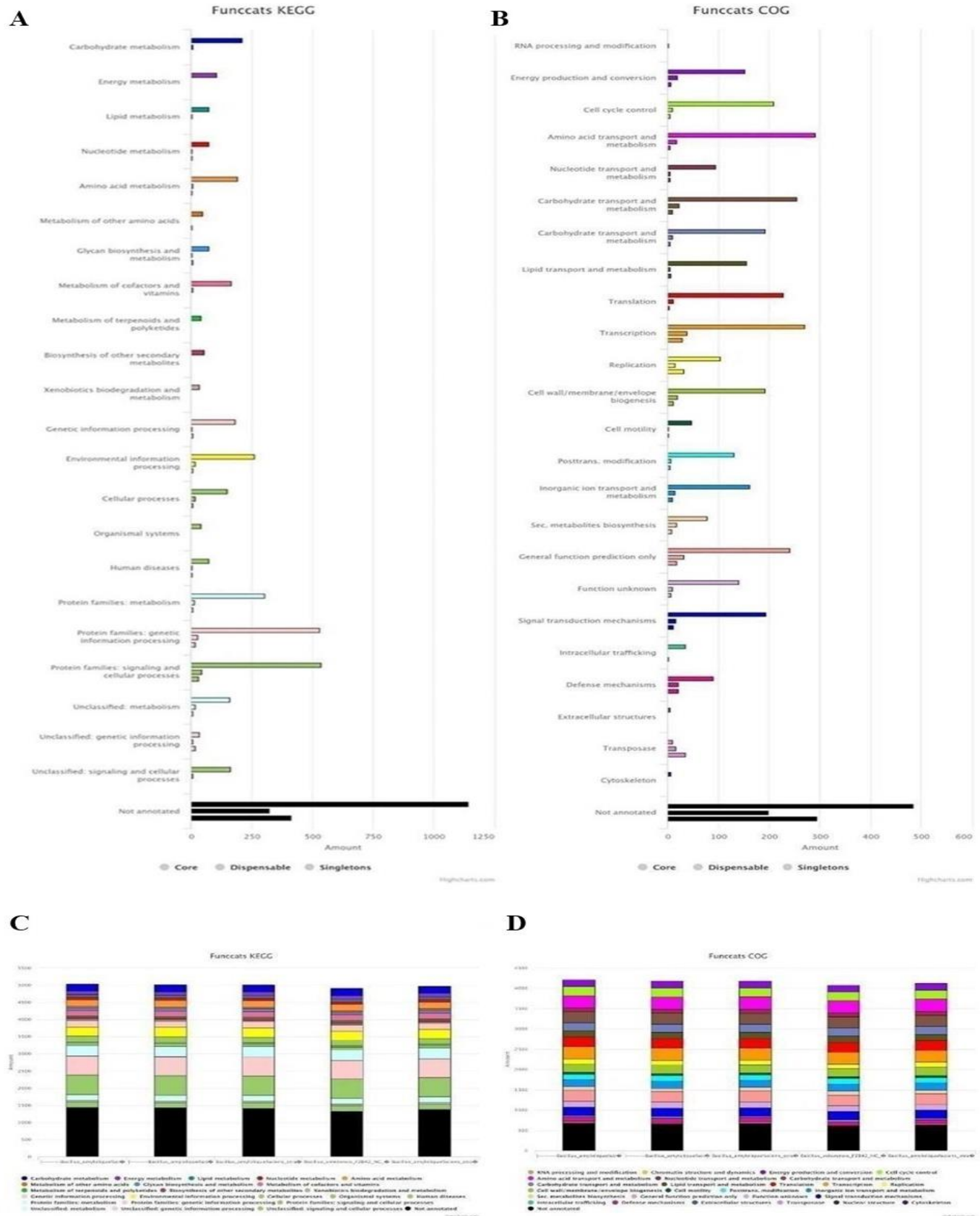
| | | | | | | |
|---|------------|-----------------|-----------|------|------|----|
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> | 168 | GCA_000009045.1 | 4,215,606 | 43.5 | 20,9 | 80 |
| <i>Bacillus tequilensis</i> | EA-CB0015 | GCA_012225885.1 | 4,012,371 | 43.5 | 21,1 | 81 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | FZB42 | GCA_000015785.2 | 3,918,596 | 46.5 | 90,3 | 99 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | 12Y | GCA_029542425.1 | 4,371,985 | 46.0 | 84,2 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | 160 | GCA_029282585.1 | 4,296,610 | 46.0 | 80,4 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | A4P130 | GCA_021228895.1 | 4,240,800 | 46.0 | 89,2 | 99 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | B19 | GCA_029398215.1 | 4,382,865 | 45.5 | 85 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | Bac57 | GCA_003667745.1 | 4,226,250 | 46.0 | 85,6 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | DSYZ | GCA_003285085.1 | 4,258,978 | 46.0 | 89,7 | 99 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | ID-A03 | GCA_029636845.1 | 4,293,099 | 46.0 | 86 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | JS25R | GCA_000769555.1 | 4,006,002 | 46.5 | 86 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | LOH112 | GCA_022313395.1 | 4,292,903 | 46.0 | 83,7 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | Lzh-a42 | GCA_002844125.1 | 4,246,605 | 46.0 | 85,2 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | PEBA20 | GCA_016859395.1 | 4,284,837 | 46.0 | 85,2 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | SH-1471 | GCA_030378485.1 | 4,181,346 | 46.0 | 86,1 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | SRCM123422 | GCA_030369935.1 | 4,243,763 | 46.0 | 83,6 | 98 |
| <i>Bacillus velezensis</i> | W1 | GCA_003265265.1 | 4,237,431 | 46.0 | 85,9 | 98 |
| <i>Bacillus xiamenensis</i> | VV3 | GCA_001857925.1 | 3,637,729 | 41.5 | 19,2 | 78 |



Prilog 38. Filogram konstruiran na osnovu vrednosti ANI i BIONJ metode grupisanja. *B. amyloliquefaciens* sojevi identifikovani kao *B. velezensis* u TYGS su grupisani zajedno sa *B. velezensis* sojevima. Crveno uokvireni su sojevi koji su pokazali najveću sličnost sa *B. velezensis* SS-38.4.



Prilog 39. Usporedni prikaz genskog sadržaja sojeva *B. velezensis* SS-38.4, GKT04, HM618 i JP3042, sa *B. velezensis* FZB 42 kao referentnim sojem.



Prilog 40. Slike A i B predstavljaju gene pangenoma raspoređene prema funkcionalnim kategorijama KEGG (A) i COG (B) anotacija. Slike C i D predstavljaju broj gena u svakoj KEGG i COG funkcionalnoj kategoriji u genomima sojeva GKT04, HM618, JP3042; FZB 42, SS-38.4.

Prilog 41. Geni *B. velezensis* SS-38.4 značajni za biokontrolnu aktivnost i adaptacije na uslove u filozferi.

| Put | Geni | Produkt | GO funkcija/GO proces | Locus_tag |
|--|--------|---|---|-------------|
| 12.1 PGP osobine | | | | |
| Transport i metabolizam fosfata | ppaX | Manganese-dependent inorganic pyrophosphatase | inorganic diphosphate phosphatase activity GO:0004427 | VDJ78_05275 |
| | phoH | Predicted ATPase related to phosphate starvation-inducible protein PhoH | / | VDJ78_12990 |
| | phoH | Phosphate starvation-inducible protein PhoH | GO:0005524 - ATP binding | VDJ78_17430 |
| | phoA | Alkaline phosphatase | / | VDJ78_10340 |
| | phoP | Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein PhoP | GO:0003677 - DNA binding | VDJ78_18710 |
| | pitA | Probable low-affinity inorganic phosphate transporter | GO:0006817 - phosphate ion transport GO:0015114 - phosphate ion transmembrane transporter activity | VDJ78_11995 |
| | phoU | Sodium-dependent phosphate transporter | / | VDJ78_17470 |
| | phoR | Phosphate regulon sensor protein PhoR | / | VDJ78_18705 |
| | ppaX | Pyrophosphatase PpaX | / | VDJ78_02605 |
| Transport i sinteza organskih kiselina | ackA | Acetate kinase | GO:0008776 - acetate kinase activity | VDJ78_18845 |
| | mdh | Malate dehydrogenase | GO:0016616 - oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor | VDJ78_18715 |
| | gltA | Citrate synthase | / | VDJ78_10355 |
| | gltA | Citrate synthase | / | VDJ78_18725 |
| | kefA | Potassium efflux system KefA protein / Small-conductance mechanosensitive channel | GO:0008381 - mechanosensitive monoatomic channel activity | VDJ78_09570 |
| | kefA | Potassium efflux system KefA protein / Small-conductance mechanosensitive channel | GO:0008381 - mechanosensitive monoatomic channel activity | VDJ78_12660 |
| | mntP | Putative manganese efflux pump | / | VDJ78_03535 |
| | mntH | Manganese transport protein | GO:0022857 - transmembrane transporter activity | VDJ78_07880 |
| Transport i metabolizam gvožđa i produkcija siderofora | htsABC | Heme ABC type transporter HtsABC | GO:0008668 - 2,3-dihydroxybenzoyl adenylate synthase activity | VDJ78_00975 |
| | hyp1 | Heme-degrading monooxygenase | / | VDJ78_07570 |
| | ceuB | Uncharacterized iron compound ABC uptake transporter | / | VDJ78_10780 |

| | | | | |
|--------------------------------------|------|---|--|-------------|
| | ceuC | Uncharacterized iron compound ABC uptake transporter | / | VDJ78_07555 |
| | ceuD | Uncharacterized iron compound ABC uptake transporter | / | VDJ78_07560 |
| | ceuA | Uncharacterized iron compound ABC uptake transporter | / | VDJ78_07565 |
| | walJ | Zn-dependent hydrolase YycJ/WalJ | / | VDJ78_05135 |
| | yufL | Two-component response regulator | / | VDJ78_00765 |
| | malk | Two-component sensor histidine kinase | / | VDJ78_00760 |
| | dhbA | 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase | GO:0008667 -2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase activity | VDJ78_00985 |
| | dhbB | Isochorismatase | / | VDJ78_00970 |
| | dhbC | Isochorismate synthase | / | VDJ78_00980 |
| | dhbE | 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase | / | VDJ78_00965 |
| | dhbF | Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase modules | / | VDJ78_00990 |
| | yuil | Trilactone hydrolase [bacillibactin] siderophore | / | VDJ78_06560 |
| | feuA | Fe-bacillibactin uptake system FeuA | / | VDJ78_06555 |
| | feuB | Fe-bacillibactin uptake system FeuB | GO:0140359 - ABC-type transporter activity | VDJ78_06550 |
| | feuC | Fe-bacillibactin uptake system FeuC | / | VDJ78_09190 |
| | yycJ | Siderophore biosynthesis protein | / | VDJ78_10540 |
| | fepC | ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system | GO:0016887 - ATP hydrolysis activity | VDJ78_01495 |
| | yfmO | Siderophore transport protein | / | VDJ78_14000 |
| Metabolizam triptofana i sinteza IAA | yvbK | Uncharacterized N-acetyltransferase YvbK, GNAT-family | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_02025 |
| | yncA | Acetyltransferase, GNAT family | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_03350 |
| | yybD | GNAT family acetyltransferase YybD | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_05345 |
| | ND | acetyltransferase, GNAT family protein | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_05455 |
| | ND | acetyltransferase, GNAT family | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_08175 |
| | ynaD | GNAT family acetyltransferase Bsu1753 | / | VDJ78_08490 |
| | yesJ | Uncharacterized N-acetyltransferase, GNAT family | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_09175 |
| | yesJ | acetyltransferase, GNAT family | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_11030 |
| | yjcF | GNAT family acetyltransferase | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_11485 |
| | yjcF | Acetyltransferase, GNAT family | / | VDJ78_14420 |
| | ND | Acetyltransferase, GNAT family | / | VDJ78_14455 |
| | ND | acetyltransferase, GNAT family | GO:0008080 - N-acetyltransferase activity | VDJ78_19240 |
| | alkH | Aldehyde dehydrogenase | / | VDJ78_04910 |
| | ND | Aldehyde dehydrogenase | / | VDJ78_09285 |
| | ald2 | Aldehyde dehydrogenase | / | VDJ78_15185 |
| | ywdH | Aldehyde dehydrogenase | / | VDJ78_18945 |

| | | | | |
|---|------|---|---|-------------|
| | gabT | Pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase | / | VDJ78_06520 |
| | trpD | Anthranilate phosphoribosyltransferase | GO:0004048 - anthranilate | VDJ78_16010 |
| | ND | Phosphoribosylanthranilate isomerase | / | VDJ78_16000 |
| | trpA | Tryptophan synthase alpha chain | GO:0004834 - tryptophan synthase activity | VDJ78_15990 |
| | trpB | Tryptophan synthase beta chain | GO:0004834 - tryptophan synthase activity | VDJ78_15995 |
| | trpC | Indole-3-glycerol phosphate synthase | / | VDJ78_16005 |
| | ND | Flavodoxin | GO:0009055 - electron transfer activity | VDJ78_12630 |
| Azotofiksacija | ND | Flavodoxin | GO:0009055 - electron transfer activity | VDJ78_12640 |
| Produkcija amonijaka | nsrR | Nitrite-sensitive transcriptional repressor | / | VDJ78_10325 |
| | nirB | Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit | / | VDJ78_07280 |
| | nirB | Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit | GO:0008942 - nitrite reductase | VDJ78_07290 |
| | nirD | Nitrite reductase [NAD(P)H] small subunit | GO:0008942 - nitrite reductase | VDJ78_07275 |
| | narI | Respiratory nitrate reductase gamma chain | GO:0008940 - nitrate reductase activity | VDJ78_03690 |
| | narJ | Respiratory nitrate reductase delta chain | GO:0051082 - unfolded protein binding | VDJ78_03695 |
| | narH | Respiratory nitrate reductase beta chain | GO:0008940 - nitrate reductase activity | VDJ78_03700 |
| | narJ | Respiratory nitrate reductase alpha chain | GO:0008940 - nitrate reductase activity | VDJ78_03705 |
| 12.2 Isparljiva organska jedinjenja (VOCs) | | | | |
| Sinteza acetoina i butandiola | ilvB | Acetolactate synthase large subunit | GO:0003984 - acetolactate synthase activity | VDJ78_18320 |
| | ilvN | Acetolactate synthase small subunit | GO:0005948 - acetolactate synthase complex | VDJ78_18315 |
| | budA | Alpha-acetolactate decarboxylase | GO:0047605 - acetolactate decarboxylase activity | VDJ78_03100 |
| | alsS | Acetolactate synthase, catabolic | GO:0003984 - acetolactate synthase activity | VDJ78_03105 |
| | alsR | Transcriptional regulator of alpha-acetolactate operon | / | VDJ78_03110 |
| | ND | 2,3-butanediol dehydrogenase | / | VDJ78_08855 |
| | lpdA | Dihydrolipoamide dehydrogenase of acetoin dehydrogenase | GO:0004148 - dihydrolipoyl dehydrogenase activity | VDJ78_09645 |
| 12.3 Kolonizacija biljke | | | | |
| Pokretljivost | flgB | Flagellar basal-body rod protein | GO:0005198 - structural molecule activity | VDJ78_13670 |
| | flgC | Flagellar basal-body rod protein | GO:0005198 - structural molecule activity | VDJ78_13675 |
| | flgD | Flagellar basal-body rod modification protein | / | VDJ78_13720 |
| | flgE | Flagellar hook protein | / | VDJ78_13725 |
| | flgG | Flagellar basal-body rod protein | GO:0071973 - bacterial-type flagellum-dependent cell motility | VDJ78_03280 |
| | flgF | Flagellar basal-body rod protein | GO:0071973 - bacterial-type flagellum-dependent cell motility | VDJ78_03275 |
| | flgL | Flagellar hook-associated protein | GO:0005198 - structural molecule activity | VDJ78_02795 |
| | flgK | Flagellar hook-associated protein | GO:0005198 - structural molecule activity | VDJ78_02800 |

| | | | | |
|------------------|-----------|--|--|-------------|
| | flgN | Flagellar biosynthesis protein | / | VDJ78_02805 |
| | flhB | Flagellar biosynthesis protein | / | VDJ78_13775 |
| | flhB | Flagellar biosynthesis protein | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | VDJ78_13780 |
| | flhA | Flagellar biosynthesis protein | GO:0005525 - GTP binding | VDJ78_13785 |
| | flbB | Flagellar protein | / | VDJ78_13710 |
| | fliG | Flagellar motor switch protein | GO:0005198 - structural molecule activity | VDJ78_13690 |
| | fliH | Flagellar assembly protein | / | VDJ78_13695 |
| | fliI | Flagellum-specific ATP synthase | GO:0016887 - ATP hydrolysis activity | VDJ78_13700 |
| | fliJ | Flagellar protein | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | VDJ78_13705 |
| | fliK | Flagellar hook-length control protein | / | VDJ78_13715 |
| | fliM | Flagellar motor switch protein | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | VDJ78_13740 |
| | flaA | Flagellin protein | GO:0005198 - structural molecule activity | VDJ78_02775 |
| | fliN | Flagellar motor switch protein | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | VDJ78_13745 |
| | fliP | Flagellar biosynthesis protein | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | VDJ78_13760 |
| | fliQ | Flagellar biosynthesis protein | / | VDJ78_13765 |
| | fliR | Flagellar biosynthesis protein | GO:0044780 - bacterial-type flagellum assembly | VDJ78_13770 |
| | fleN | Flagellar synthesis regulator | / | VDJ78_13790 |
| | sigD | RNA polymerase sigma factor for flagellar operon | / | VDJ78_13820 |
| | rpoD | RNA polymerase sigma factor | GO:0016987 - sigma factor activity | VDJ78_17360 |
| | rpoN | RNA polymerase sigma-54 factor | GO:0016987 - sigma factor activity | VDJ78_02250 |
| | fliS | Flagellar biosynthesis protein | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | VDJ78_02765 |
| | flbD | Flagellar protein | / | VDJ78_13730 |
| | motB | Flagellar motor rotation protein | / | VDJ78_12375 |
| | motA | Flagellar motor rotation protein | / | VDJ78_12380 |
| | motB | Flagellar motor rotation protein | / | VDJ78_19045 |
| | motA | Flagellar motor rotation protein | / | VDJ78_19050 |
| Sinteza biofilma | cpsB/capC | Manganese-dependent protein-tyrosine phosphatase | GO:0030145 - manganese ion binding | VDJ78_03205 |
| | epsC | Tyrosine-protein kinase transmembrane modulator | GO:0009103 - lipopolysaccharide biosynthetic process | VDJ78_02330 |
| | epsC | Tyrosine-protein kinase transmembrane modulator | GO:0009103 - lipopolysaccharide biosynthetic process | VDJ78_03215 |
| | epsD | Tyrosine-protein kinase | GO:0004713 - protein tyrosine kinase activity | VDJ78_03210 |

| | | | | |
|------------------------------------|--|---|--|-------------|
| | epsD | Tyrosine-protein kinase | GO:0004713 - protein tyrosine kinase activity | VDJ78_02325 |
| | sipW | Signal peptidase | GO:0004252 - serine-type endopeptidase activity | VDJ78_17090 |
| | yqxM | YqxM protein, required for localization of TasA | / | VDJ78_17095 |
| | tasA | Stationary phase secreted protein TasA | / | VDJ78_17085 |
| Produkcija surfaktina | ND | Positive regulation of late competence genes and surfactin production | GO:0003677 - DNA binding | VDJ78_00835 |
| | sfrAA | Polyketide synthase modules and related proteins | GO:1904091 - non-ribosomal peptide synthetase activity | VDJ78_07350 |
| | sfrAB | Polyketide synthase modules and related proteins | GO:1904091 - non-ribosomal peptide synthetase activity | VDJ78_07355 |
| | sfrAC | Polyketide synthase modules and related proteins | GO:1904091 - non-ribosomal peptide synthetase activity | VDJ78_07370 |
| | sfrAD | Thioesterase | / | VDJ78_07375 |
| | comS | Competence protein | / | VDJ78_07360 |
| | comK | Competence protein | / | VDJ78_10825 |
| | phrH | Response regulator aspartate phosphatase H | / | VDJ78_03410 |
| | phrH | Response regulator aspartate phosphatase H | / | VDJ78_07065 |
| | ND | Response regulator aspartate phosphatase D | / | VDJ78_03270 |
| ND | Response regulator aspartate phosphatase C | / | VDJ78_07535 | |
| 12.4 Ekstracelularni enzimi | | | | |
| Enzimi sa ulogama u biokontroli | ND | beta-1,4-glucanase (cellulase) | GO:0004553 - hydrolase activity | VDJ78_14715 |
| | ND | Lipase/Acylhydrolase with GDSL-like motif | / | VDJ78_15515 |
| | yqhO | Uncharacterized lipase | / | VDJ78_17030 |
| | pldB | Lysophospholipase | GO:0016787 - hydrolase activity | VDJ78_19365 |
| | vpr | Minor extracellular protease | GO:0008236 - serine-type peptidase activity | VDJ78_04125 |
| | ysdC | Putative aminopeptidase | / | VDJ78_18575 |
| | amyA | Alpha-amylase | / | VDJ78_07165 |
| | xynA | Endo-1,4-beta-xylanase | / | VDJ78_03375 |
| | xynC | Glucuronoarabinoxylan endo-1,4-beta-xylanase | / | VDJ78_14735 |
| | manA | Mannose-6-phosphate isomerase | GO:0004476 - mannose-6-phosphate isomerase activity | VDJ78_02975 |
| | manA | Mannose-6-phosphate isomerase | GO:0004476 - mannose-6-phosphate isomerase activity | VDJ78_04450 |
| | ND | Mannan endo-1,4-beta-mannosidase | GO:0004553 - hydrolase activity | VDJ78_04455 |
| | ND | Mannose-6-phosphate isomerase | / | VDJ78_08310 |

| | | | | |
|---|-----------|--|--|-------------|
| | manA | Mannose-6-phosphate isomerase | GO:0004476 - mannose-6-phosphate isomerase activity | VDJ78_17715 |
| | xynB | Xylan 1,4-beta-xylosidase | GO:0009044 - xylan 1,4-beta-xylosidase activity | VDJ78_14340 |
| | xylA | Xylose isomerase | GO:0009045 - xylose isomerase activity | VDJ78_14350 |
| Quorum quenching | ytnP | Quorum-quenching lactonase YtnP | / | VDJ78_19125 |
| | phnP | Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily I | / | VDJ78_10745 |
| 12.5 Adaptacije na negativne faktore sredine | | | | |
| Odgovor na oksidativni stres | perR | Peroxide stress regulator | / | VDJ78_09885 |
| | fur | Ferric uptake regulation protein | / | VDJ78_16420 |
| | marR | Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator | GO:0003700 - DNA-binding transcription factor activity | VDJ78_08210 |
| | ND | Organic hydroperoxide resistance protein | / | VDJ78_12125 |
| | marR | Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator | GO:0003700 - DNA-binding transcription factor activity | VDJ78_12130 |
| | ND | Organic hydroperoxide resistance protein | / | VDJ78_12135 |
| | sodA | Superoxide dismutase [Fe] | / | VDJ78_15195 |
| | sodC | Superoxide dismutase [Cu-Zn] | / | VDJ78_15235 |
| | sodA | Superoxide dismutase [Mn] | GO:0004784 - superoxide dismutase activity | VDJ78_17275 |
| | btuE | Glutathione peroxidase | GO:0004602 - glutathione peroxidase activity | VDJ78_15590 |
| Odgovor na osmotski stres | glpF | Glycerol uptake facilitator protein | GO:0015267 - channel activity | VDJ78_10275 |
| | betB | Betaine aldehyde dehydrogenase | GO:0008802 - betaine-aldehyde dehydrogenase activity | VDJ78_19675 |
| | opuD | Glycine betaine transporter | GO:0022857 - transmembrane transporter activity | VDJ78_19205 |
| | opuAA | Glycine betaine ABC transport system | / | VDJ78_07135 |
| | opuAB | Glycine betaine ABC transport system | / | VDJ78_07140 |
| | opuAC | Glycine betaine ABC transport system | GO:0022857 - transmembrane transporter activity | VDJ78_07145 |
| | opuBD | Choline ABC transport system | GO:0140359 - ABC-type transporter activity | VDJ78_01960 |
| | opuBC | Choline ABC transport system | / | VDJ78_01965 |
| | opuBB | Choline ABC transport system | GO:0140359 - ABC-type transporter activity | VDJ78_01970 |
| | opuBA | Choline ABC transport system | GO:0005524 - ATP binding | VDJ78_01975 |
| | gbsR/marR | Transcriptional regulator | / | VDJ78_01980 |
| | opuCD | Choline ABC transport system | / | VDJ78_01985 |
| | opuCC | Choline ABC transport system | / | VDJ78_01990 |
| | opuBB | Choline ABC transport system | GO:0140359 - ABC-type transporter activity | VDJ78_01995 |
| | opuCA | Choline ABC transport system | / | VDJ78_02000 |
| | gbsB | Alcohol dehydrogenase GbsB (type III) | / | VDJ78_19670 |
| | opuE | Osmoregulated sodium/proline symporter | GO:0005298 - proline:sodium symporter activity | VDJ78_09075 |

| | | | | |
|---|-----------|---|--|-------------|
| Odgovor na gladovanje (Stringent response) | cstA | Carbon starvation protein A | GO:0006109 - regulation of carbohydrate metabolic process | VDJ78_18520 |
| | csrA | Carbon storage regulator | GO:0006109 - regulation of carbohydrate metabolic process | VDJ78_02780 |
| Zaštita od UV-zračenja | uvrE | UV DNA damage endonuclease | GO:0004518 - nuclease activity | VDJ78_03665 |
| 12.6 Sekundarni metaboliti | | | | |
| Bacteriocini, ribosomalno sintetisani antibakterijski peptidi | bceB | Bacitracin export permease protein | GO:0140359 - ABC-type transporter activity | VDJ78_19275 |
| | bceA | Bacitracin export ATP-binding protein | GO:0016887 - ATP hydrolysis activity | VDJ78_19280 |
| | bceS | Two-component sensor histidine kinase | GO:0004673 - protein histidine kinase activity | VDJ78_19285 |
| | bceR | Two-component response regulator | GO:0003677 - DNA binding | VDJ78_19290 |
| | liaG | Conserved protein LiaG in B. subtilis in Lia cluster | / | VDJ78_01585 |
| | liaH | Protein LiaH, similar to phage shock protein A | / | VDJ78_01590 |
| | liaI | Protein LiaI | / | VDJ78_01595 |
| | ND | Hypothetical protein/uberolysin/carnocyclin family circular = Bacteriocin (Amylocyclin) | / | VDJ78_01075 |
| Poliketidi | bpsA | Type III polyketide synthase producing alkylpyrones | / | VDJ78_15680 |
| | bpsB | Alkylpyrone O-methyltransferase | / | VDJ78_15675 |
| 12.7 Geni za rezistentnost | | | | |
| Rezistentnost na antibiotike i toksične elemente | satA | Streptothricin acetyltransferase | / | VDJ78_17685 |
| | ND | Multi antimicrobial extrusion protein (Na(+)/drug antiporter),MATE family of MDR efflux pumps | GO:0042910 - xenobiotic transmembrane transporter activity | VDJ78_15255 |
| | ND | Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase | GO:0046872 - metal ion binding | VDJ78_12480 |
| | ND | Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase | GO:0019829 - ATPase-coupled monoatomic cation transmembrane transporter activity | VDJ78_01805 |
| | bcr/cflA | Multidrug resistance transporter | GO:0022857 - transmembrane transporter activity | VDJ78_03965 |
| | copC/copD | Copper resistance protein CopC / Copper resistance protein CopD | / | VDJ78_07630 |
| | ND | Choloyglycine hydrolase | / | VDJ78_04470 |
| | ND | Cobalt-zinc-cadmium resistance protein | GO:0008324 - monoatomic cation transmembrane transporter activity | VDJ78_06955 |

| | | | |
|------|--|---|-------------|
| ND | Cobalt-zinc-cadmium resistance protein | GO:0008324 - monoatomic cation transmembrane transporter activity | VDJ78_07985 |
| ND | Cobalt-zinc-cadmium resistance protein | GO:0008324 - monoatomic cation transmembrane transporter activity | VDJ78_08890 |
| ND | Cobalt-zinc-cadmium resistance protein | GO:0008324 - monoatomic cation transmembrane transporter activity | VDJ78_18995 |
| merR | Transcriptional regulator, MerR family | GO:0003677 - DNA binding | VDJ78_01295 |
| merR | Transcriptional regulator, MerR family | GO:0003677 - DNA binding | VDJ78_04290 |
| fosM | Fosfomycin resistance protein FosB | / | VDJ78_11110 |

Prilog 42. Geni *P. syringae* pv. *aptata* P21 značajni za interakciju sa *B. velezensis* SS-38.4.

| Put | Geni | Produkt | GO funkcija/GO proces | Locus_tag |
|--|----------------------------------|--|--|-------------|
| 12.1 PGP osobine | | | | |
| Transport i metabolizam fosfata | phoU | Phosphate transport system regulatory protein | GO:0003700 - DNA-binding transcription factor activity | KJW28_14860 |
| | phoR | Phosphate regulon sensor protein | GO:0000155 - phosphorelay sensor kinase activity | KJW28_14880 |
| | phoB | Phosphate regulon transcriptional regulatory protein | GO:0000160 - phosphorelay signal transduction system | KJW28_14865 |
| | phoB | Phosphate regulon transcriptional regulatory protein | GO:0000156 - phosphorelay response regulator activity | KJW28_14885 |
| | ppk1 | Polyphosphate kinase | GO:0008976 - polyphosphate kinase activity | KJW28_21905 |
| | ppa | Inorganic pyrophosphatase | GO:0004427 - inorganic diphosphatase activity | KJW28_21490 |
| | ND | NAD(P) transhydrogenase subunit beta | / | KJW28_14955 |
| | sthA | Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase | GO:0003957 - NAD(P)+ transhydrogenase (B-specific) activity | KJW28_14215 |
| | phoH | Predicted ATPase related to phosphate starvation-inducible protein | GO:0005524 - ATP binding | KJW28_16070 |
| | phoH | Phosphate starvation-inducible protein | / | KJW28_03745 |
| | ND | Low-affinity inorganic phosphate transporter | / | KJW28_16255 |
| | ND | Low-affinity inorganic phosphate transporter | / | KJW28_26810 |
| | phoU | Phosphate transport system regulatory protein PhoU | GO:0003700 - DNA-binding transcription factor activity | KJW28_14860 |
| | ppk1 | Polyphosphate kinase | GO:0008976 - polyphosphate kinase activity | KJW28_21905 |
| | ppx | Exopolyphosphatase | GO:0004309 - exopolyphosphatase activity | KJW28_21910 |
| | ppqA | pyrroloquinoline quinone precursor peptide | GO:0003824 - catalytic activity | KJW28_24585 |
| | ppqB | Coenzyme PQQ synthesis protein B | GO:0018189 - pyrroloquinoline quinone biosynthetic process | KJW28_24590 |
| | ppqC | pyrroloquinoline-quinone synthase | GO:0018189 - pyrroloquinoline quinone biosynthetic process | KJW28_24595 |
| | ppqD | Coenzyme PQQ synthesis protein D | GO:0048038 - quinone binding | KJW28_24600 |
| | ppqE | Coenzyme PQQ synthesis protein E | GO:0018149 - peptide cross-linking | KJW28_24605 |
| ppqF | Coenzyme PQQ synthesis protein F | GO:0004222 - metalloendopeptidase activity | KJW28_24580 | |
| Transport i sinteza organskih kiselina | kdpA | Potassium-transporting ATPase A chain | GO:0008556 - P-type potassium transmembrane transporter activity | KJW28_24395 |

| | | | | |
|--|------|--|--|-------------|
| | kdpB | Potassium-transporting ATPase B chain | GO:0008556 - P-type potassium transmembrane transporter activity | KJW28_24390 |
| | kdpC | Potassium-transporting ATPase C chain | GO:0008556 - P-type potassium transmembrane transporter activity | KJW28_24385 |
| | kup | Kup system potassium uptake protein | / | KJW28_02080 |
| | mscL | Large-conductance mechanosensitive channel | GO:0008381 - mechanosensitive ion channel activity | KJW28_24160 |
| | kefA | Potassium efflux system KefA protein | / | KJW28_22360 |
| | kefA | Potassium efflux system KefA protein | / | KJW28_03105 |
| | mntH | Manganese transport protein MntH | GO:0022857 - transmembrane transporter activity | KJW28_05750 |
| | ND | Manganese catalase | / | KJW28_14570 |
| | mntP | Putative manganese efflux pump MntP | / | KJW28_19050 |
| Transport i metabolizam gvožđa i produkcija siderofora | acsA | Achromobactin biosynthesis protein | / | KJW28_04525 |
| | acsB | Achromobactin biosynthesis protein | GO:0003824 - catalytic activity | KJW28_04520 |
| | acsE | Achromobactin biosynthesis protein | / | KJW28_04505 |
| | acsD | Achromobactin biosynthesis protein | GO:0055085 - transmembrane transport | KJW28_04500 |
| | acsF | Achromobactin biosynthesis protein | GO:0008483 - transaminase activity | KJW28_04495 |
| | ND | Putative achromobactin biosynthesis protein | / | KJW28_04555 |
| | ND | Uncharacterized Fe-S protein in siderophore biosynthesis operon | GO:0051537 - 2 iron, 2 sulfur cluster binding | KJW28_04550 |
| | ND | TonB-dependent ferric achromobactin receptor protein | / | KJW28_04490 |
| | ND | Siderophore achromobactin ABC transporter | / | KJW28_04545 |
| | ND | Siderophore achromobactin ABC transporter | / | KJW28_04540 |
| | ND | Siderophore achromobactin ABC transporter | / | KJW28_04535 |
| | ND | Siderophore achromobactin ABC transporter | / | KJW28_04530 |
| | acsC | Uncharacterized siderophore S biosynthesis protein | / | KJW28_04515 |
| | ND | Permease of the major facilitator superfamily in uncharacterized siderophore S biosynthesis operon | GO:0006855 - xenobiotic transmembrane transport | KJW28_04510 |
| | ND | Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase modules | / | KJW28_04405 |
| | ND | Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase modules | / | KJW28_07515 |
| | ND | Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase modules | / | KJW28_07520 |

| | | | | |
|--------------------------------------|------|--|---|-------------|
| | ND | Siderophore biosynthesis diaminobutyrate-2-oxoglutarate aminotransferase | GO:0008483 - transaminase activity | KJW28_08265 |
| | exbB | Ferric siderophore transport system | / | KJW28_12465 |
| | ND | Putative OMR family iron-siderophore receptor precursor | GO:0015343 - siderophore transmembrane transporter activity | KJW28_14285 |
| | sbnA | 2,3-diaminopropionate for siderophore biosynthesis protein | GO:0009058 - biosynthetic process | KJW28_14460 |
| | ND | Non-ribosomal peptide synthetase modules | / | KJW28_14470 |
| | sbnB | 2,3-diaminopropionate for siderophore biosynthesis protein | GO:0009058 - biosynthetic process | KJW28_14475 |
| | fecR | Iron siderophore sensor protein | / | KJW28_17975 |
| | fecA | Iron(III) dicitrate transport protein FecA | GO:0015891 - siderophore transport | KJW28_17980 |
| | sbnA | 2,3-diaminopropionate for siderophore biosynthesis protein SbnA | GO:0016491 - oxidoreductase activity | KJW28_20360 |
| | pvdI | Pyoverdine sidechain non-ribosomal peptide synthetase | / | KJW28_22055 |
| | ND | Non-ribosomal peptide synthetase modules, pyoverdine | / | KJW28_22060 |
| | sydD | ABC-type siderophore export system | GO:0022857 - transmembrane transporter activity | KJW28_23790 |
| | fpvA | Outer membrane ferripyoverdine receptor FpvA | GO:0015343 - siderophore transmembrane transporter activity | KJW28_25350 |
| | fpvA | Outer membrane ferripyoverdine receptor FpvA | GO:0015343 - siderophore transmembrane transporter activity | KJW28_25355 |
| | trpD | Anthranilate phosphoribosyltransferase | GO:0000162 - tryptophan biosynthetic process | KJW28_17325 |
| Metabolizam triptofana i sinteza IAA | ND | Phosphoribosylanthranilate isomerase | GO:0004640 - phosphoribosylanthranilate isomerase activity | KJW28_01340 |
| | trpA | Tryptophan synthase alpha chain | GO:0004834 - tryptophan synthase activity | KJW28_19480 |
| | trpB | Tryptophan synthase beta chain | GO:0004834 - tryptophan synthase activity | KJW28_19475 |
| | trpE | Anthranilate synthase, aminase component | GO:0004049 - anthranilate synthase activity | KJW28_17195 |
| | ND | Anthranilate synthase | / | KJW28_17320 |
| | trpC | Indole-3-glycerol phosphate synthase | GO:0004425 - indole-3-glycerol-phosphate synthase activity | KJW28_17330 |
| | trpC | Indole-3-glycerol phosphate synthase | GO:0004425 - indole-3-glycerol-phosphate synthase activity | KJW28_23025 |
| | ND | Para-aminobenzoate synthase | / | KJW28_22280 |
| | pabC | Aminodeoxychorismate lyase | GO:0030170 - pyridoxal phosphate binding | KJW28_01405 |
| | / | / | / | / |
| Azotofiksacija | / | / | / | / |

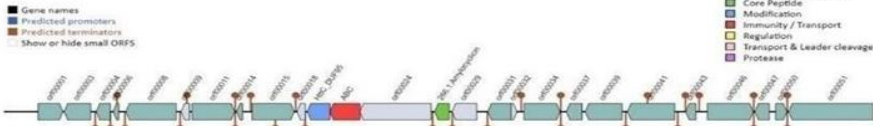
| | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|--|---|-------------|
| Produkcija amonijaka | nirD | Nitrite reductase [NAD(P)H] small subunit | GO:0008942 - nitrite reductase activity | KJW28_06660 |
| | nirB | Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit | GO:0008942 - nitrite reductase activity | KJW28_06665 |
| | ND | Nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit | / | KJW28_24825 |
| 12.3 Kolonizacija biljke | | | | |
| Pokretljivost | flgA | Flagellar basal-body P-ring formation protein FlgA | GO:0044780 - bacterial-type flagellum assembly | KJW28_23700 |
| | flgB | Flagellar basal-body rod protein FlgB | GO:0005198 - structural molecule activity | KJW28_23670 |
| | flgC | Flagellar basal-body rod protein FlgC | GO:0005198 - structural molecule activity | KJW28_23665 |
| | flgD | Flagellar basal-body rod modification protein FlgD | / | KJW28_23660 |
| | flgE | Flagellar hook protein FlgE | / | KJW28_23655 |
| | flgE | Flagellar hook protein FlgE | / | KJW28_23650 |
| | flgF | Flagellar basal-body rod protein FlgF | / | KJW28_23640 |
| | flgG | Flagellar basal-body rod protein FlgG | GO:0071973 - bacterial-type flagellum-dependent cell motility | KJW28_23635 |
| | flgH | Flagellar L-ring protein FlgH | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | KJW28_23630 |
| | flgI | Flagellar P-ring protein FlgI | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | KJW28_23630 |
| | flgK | Flagellar hook-associated protein FlgK | GO:0005198 - structural molecule activity | KJW28_23615 |
| | flgL | Flagellar hook-associated protein FlgL | GO:0005198 - structural molecule activity | KJW28_23610 |
| | flgN | Flagellar biosynthesis protein FlgN | / | KJW28_23710 |
| | flgA | Flagellar biosynthesis protein FlhA | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | KJW28_23460 |
| | fliE | Flagellar hook-basal body complex protein FliE | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | KJW28_23550 |
| | fliF | Flagellar M-ring protein FliF | GO:0005198 - structural molecule activity | KJW28_23545 |
| | fliG | Flagellar motor switch protein FliG | GO:0005198 - structural molecule activity | KJW28_23540 |
| | fliH | Flagellar assembly protein FliH | / | KJW28_23535 |
| | fliI | Flagellum-specific ATP synthase FliI | / | KJW28_23530 |
| | fliJ | Flagellar protein FliJ | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | KJW28_23525 |
| | fliK | Flagellar hook-length control protein FliK | / | KJW28_23505 |
| | fliM | Flagellar motor switch protein FliM | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | KJW28_23495 |
| | fliH | Flagellar biosynthesis protein FliH | GO:0003924 - GTPase activity | KJW28_23455 |
| | fliP | Flagellar biosynthesis protein FliP | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | KJW28_23480 |
| | fliQ | Flagellar biosynthesis protein FliQ | / | KJW28_23475 |
| | fliN | Flagellar synthesis regulator FliN | / | KJW28_23450 |
| | rpoN | RNA polymerase sigma-54 factor RpoN | GO:0016987 - sigma factor activity | KJW28_05080 |
| rpoD | RNA polymerase sigma factor RpoD | GO:0016987 - sigma factor activity | KJW28_17045 | |

| | | | | |
|------------------|-------|--|--|-------------|
| | fliA | RNA polymerase sigma factor for flagellar operon | / | KJW28_23445 |
| | fleQ | Flagellar regulatory protein FleQ | / | KJW28_23565 |
| | flaA | Flagellin protein FlaA | / | KJW28_23590 |
| | fliS | Flagellar biosynthesis protein FliS | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | KJW28_23575 |
| | fliO | Flagellar biosynthesis protein FliO | GO:0044781 - bacterial-type flagellum organization | KJW28_23485 |
| | flhB | Flagellar biosynthesis protein FlhB | GO:0001539 - cilium or flagellum-dependent cell motility | KJW28_23465 |
| | motA | Flagellar motor rotation protein MotA | / | KJW28_01180 |
| | motA | Flagellar motor rotation protein MotA | / | KJW28_23420 |
| | motB | Flagellar motor rotation protein MotB | / | KJW28_23415 |
| | motB | Flagellar motor rotation protein MotB | / | KJW28_01185 |
| | fleS | Flagellar sensor histidine kinase FleS | / | KJW28_23560 |
| | fliN | Flagellar motor switch protein FliN | GO:0003774 - cytoskeletal motor activity | KJW28_23490 |
| Sinteza biofilma | ND | Alginate lyase | / | KJW28_00910 |
| | ND | Alginate lyase | / | KJW28_10070 |
| | ND | Alginate biosynthesis transcriptional activator | / | KJW28_13690 |
| | alg8 | Alginate polymerase/glycosyltransferase Alg8 | / | KJW28_17845 |
| | alg44 | Alginate polymerisation protein Alg44 | / | KJW28_17850 |
| | algK | Alginate export system AlgK/AlgE | / | KJW28_17855 |
| | algE | Alginate export system AlgK/AlgE | / | KJW28_17860 |
| | algX | Alginate O-acetyltransferase AlgX, periplasmic | / | KJW28_17870 |
| | algL | Alginate lyase AlgL | / | KJW28_17875 |
| | algJ | Alginate O-acetyltransferase AlgJ, inner membrane | / | KJW28_17885 |
| | algF | Alginate O-acetyltransferase AlgF, periplasmic | / | KJW28_17890 |
| | algZ | Alginate biosynthesis two-component system sensor histidine kinase AlgZ/FimS | / | KJW28_19330 |
| | algR | Alginate biosynthesis two-component system response regulator AlgR | / | KJW28_19335 |
| | algQ | Alginate regulatory protein AlgQ, positive transcriptional regulator of AlgD | / | KJW28_19365 |
| | algP | Alginate regulatory protein AlgP, positive transcriptional regulator of AlgD | / | KJW28_19375 |
| | algB | Alginate biosynthesis two-component system response regulator AlgB | / | KJW28_21760 |

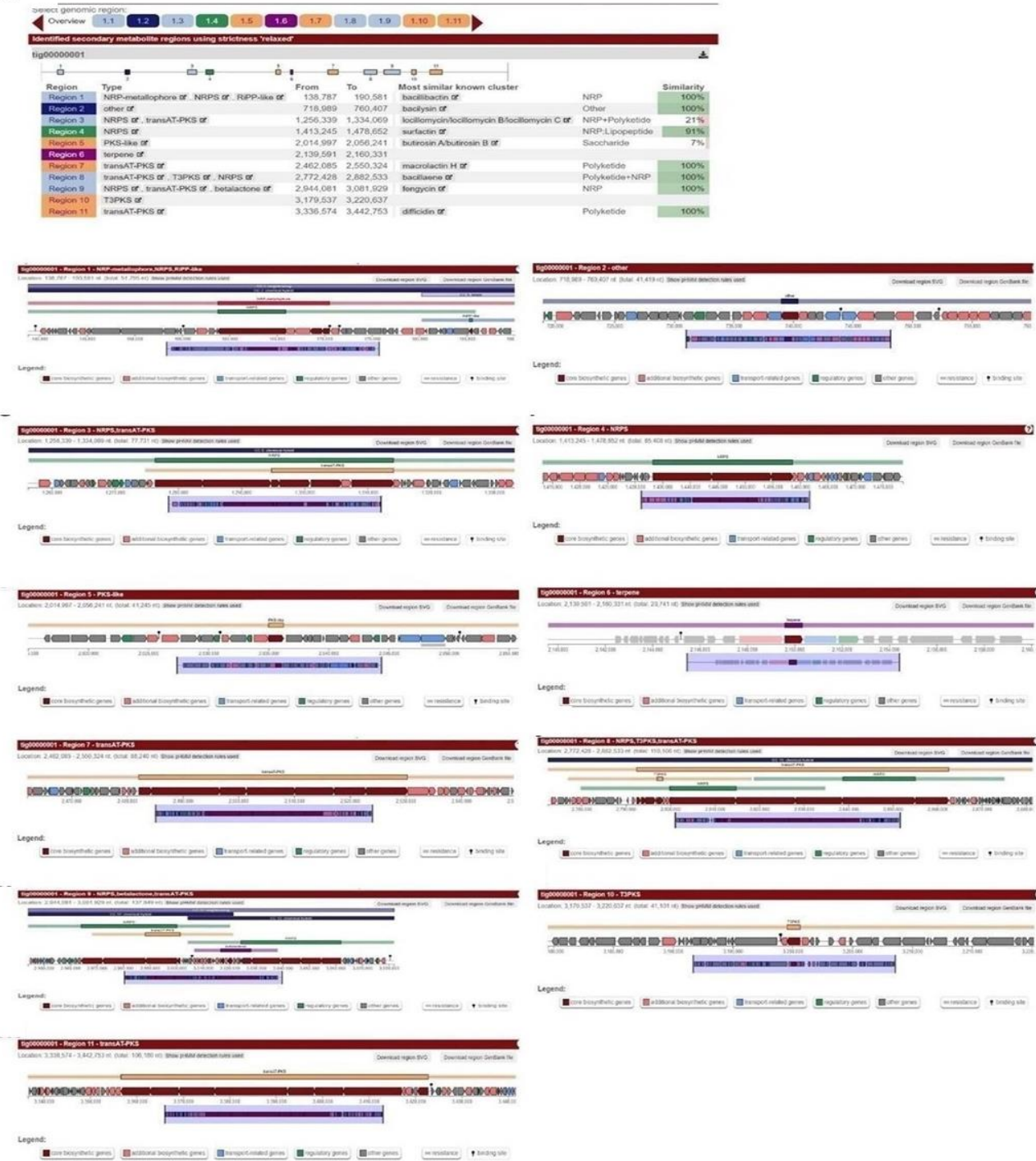
| | | | |
|------|---|---|-------------|
| kinB | Alginate biosynthesis two-component system sensor histidine kinase KinB | / | KJW28_21765 |
| ND | Alginate biosynthesis transcriptional activator | / | KJW28_22390 |
| ND | Levansucrase | / | KJW28_24840 |
| ND | Levansucrase | / | KJW28_27840 |
| ND | Levansucrase | / | KJW28_23040 |
| pslK | Pellicle/biofilm biosynthesis inner membrane protein | / | KJW28_10385 |
| pslJ | Pellicle/biofilm biosynthesis inner membrane protein PslJ | / | KJW28_10395 |
| pslI | Pellicle/biofilm biosynthesis protein PslI | / | KJW28_10400 |
| pslH | Pellicle/biofilm biosynthesis protein PslH | / | KJW28_10405 |
| pslG | Pellicle/biofilm biosynthesis protein PslG | / | KJW28_10405 |
| pslF | Pellicle/biofilm biosynthesis protein PslF | / | KJW28_10415 |
| pslE | Pellicle/biofilm biosynthesis polysaccharide copolymerase/tyrosine-kinase P | / | KJW28_10420 |
| pslD | Pellicle/biofilm biosynthesis polysaccharide copolymerase/tyrosine-kinase P | / | KJW28_10425 |
| pslA | Pellicle/biofilm biosynthesis protein PslA, polyprenyl glycosylphosphotransferase | / | KJW28_10435 |

A

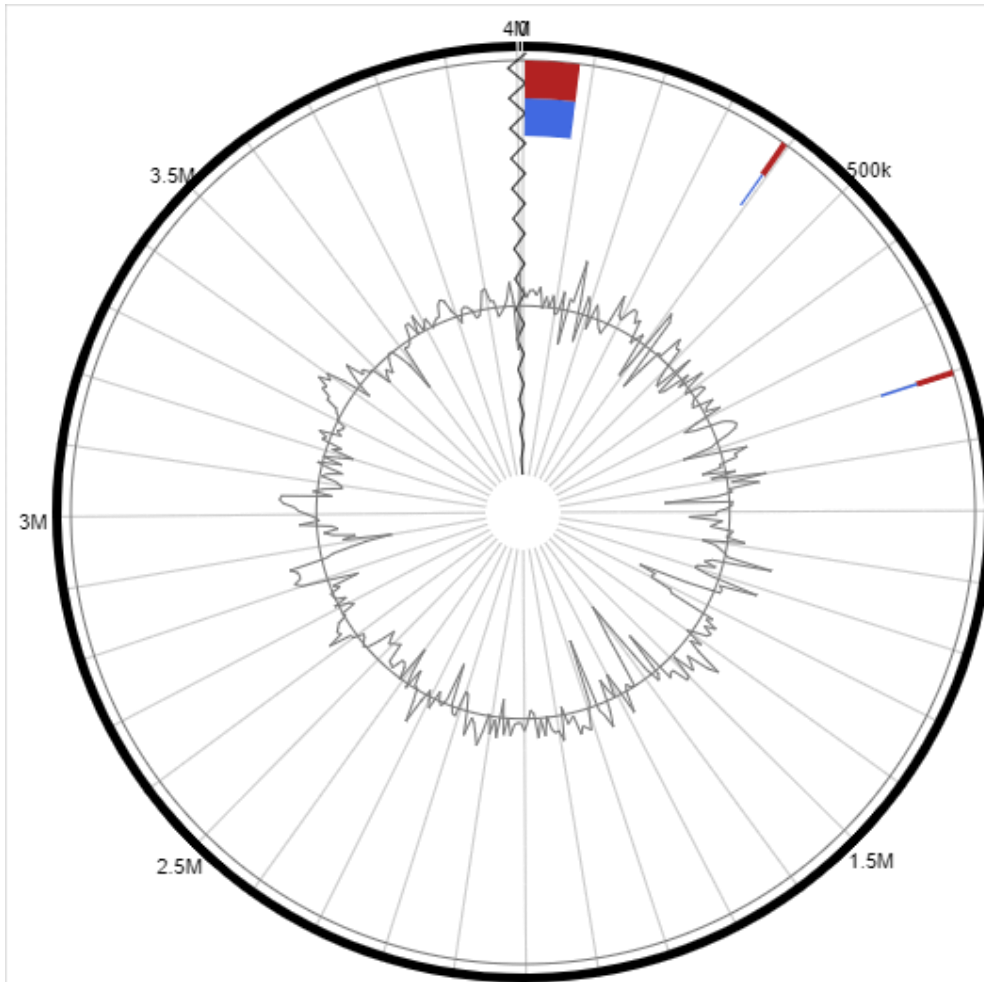
BacillusmyoliquefaciensSS38.4.fasta AOI_01



B



Prilog 43. Na Slici A prikazan je amilociklicinski genski klaster, identifikovan programom BAGEL. Na Slici B prikazane su strukture 11 biosintetičkih klastera, identifikovanim u AntiSMASH programu, sa obeleženim esencijalnim i neesencijalnim genima i genima zaduženim za regulaciju i transport



Prilog 44. Položaj tri genomska ostrvca u genomu *B. velezensis* SS-38.4. Geni odgovorni za virulenciju nisu pronađeni.

BIOGRAFIJA

Iva M. Rosić rođena je 9.5.1997. u Užicu. U Užicu je završila osnovnu školu kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“ i srednju medicinsku školu, smer farmaceutski tehničar, kao đak generacije. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija i fiziologija upisala je školske 2016/17. godine, a diplomirala 2020. godine sa prosečnom ocenom 9,60. Školske 2020/21. godine upisala je master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Biologija mikroorganizama, koje je završila sa prosečnom ocenom 10,00. Master rad pod naslovom: „Genotipizacija i određivanje DNK fragmenata specifičnih za soj u kolekciji biokontrolnih *Bacillus* spp. izolata“, uradila je na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta pod mentorstvom prof. dr Slaviše Stankovića i dr Ivana Nikolića. Školske 2021/22. upisala je doktorske akademske studije na modulu Biologija mikroorganizama na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od aprila 2022. do maja 2023. bila je zaposlena kao istraživač pripravnik na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, gde je učestvovala u nastavi na praktičnom delu kursa iz Mikrobiologije na osnovnim akademskim studijama. Takođe, u školskoj 2021/22. učestvovala je kao saradnik u realizaciji seminara iz Biologije u Istraživačkoj stanici Petnica. Od juna 2023. zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od maja 2024. kao istraživač saradnik na Institutu za fiziku, Univerziteta u Beogradu. Tokom jula i avgusta 2018. godine Iva Rosić je ostvarila istraživački boravak na Institutu Gulbenkian u Lisabonu u okviru letnje škole Undergraduate Summer School IGC (Instituto Gulbenkian de Ciencia), a septembra iste godine je u organizaciji Centra za naučno-istraživački rad studenata Biološkog fakulteta radila studentsku letnju praksu u Kliničkom centru Srbije, u Službi za patohistologiju. Učestvovala je kao volonter u više projekata, kongresa i organizacija. Mogu se izdvojiti učešće na kursu Biohemijskog društva Srbije: Biohemija u službi zdravlja-izučavanje biohemijskih i srodnih metoda koje nude rešenja u kriznim situacijama (maj 2022. godine), učešće u organizaciji i realizaciji programa za Evropsku noć istraživača 2019. godine i članstvo u omladinskoj organizaciji za zaštitu životne sredine EcoHub kao Eko-mentor učenicima osnovnih škola. Do sada je učestvovala na pet projekata i rukovodila jednim internim projektom Instituta za fiziku, finansiranim od strane SAGE projekta akceleracije inovacija i podsticanja rasta preduzetništva u Republici Srbiji, pod nazivom „Optimizacija sinteze bionanočestica gvožđa primenom bakterija“. U okviru bilateralnog projekta sa Francuskom, pod nazivom: „Očuvanje biljnog zdravlja: razvoj kapaciteta za terenski nadzor *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na usevima paradajza“, bila je u jednonedeljnoj istraživačkoj poseti Nacionalnom institutu za poljoprivredu i životnu sredinu u Avinjonu (INRAE), tokom juna 2023. godine. U okviru bilateralnog projekta sa Slovenijom, „Stvaranje kapaciteta za nadzor biljnih patogena: Razvijanje qPCR testova za detekciju *P. syringae* pv. *aptata* patogena šećerne repe“, bila je na dva jednomesečna istraživačka boravka na Nacionalnom institutu za biologiju (NIB) Ljubljani, tokom novembra 2023. i maja 2025. godine. Iva Rosić je, takođe bila nosilac stipendije Fonda za mlade talente-Dositeja za 2019/20. i 2020/21. godinu, stipendije grada Užica za talentovane učenike i studente od 2016. do 2020. godine i studentske stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Do sada je objavila pet naučnih radova, od kojih je jedan iz kategorije M21a+, dva iz kategorije M21, jedan iz kategorije M22 i jedan iz kategorije M23. Takođe je učestvovala sa 12 saopštenja na naučnim inostranim i domaćim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Ива Росић _____

Број индекса _____ Б3003/2021 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Фенотипска и генотипска анализа капацитета *Bacillus* spp. изолата за колонизацију, поспешивање раста биљака и биоконтролу

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



У Београду, 05.08.2025. год.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ива Росић

Број индекса Б3003/2021

Студијски програм Биологија

Наслов рада Фенотипска и генотипска анализа капацитета *Bacillus* spp. изолата за колонизацију, поспешивање раста биљака и биоконтролу

Ментор др Оља Медић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора



У Београду, 05.08.2025. год.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Фенотипска и генотипска анализа капацитета *Bacillus spp.* изолата за колонизацију, поспешивање раста биљака и биоконтролу

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 05.08.2025. год.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.